

Molekulare Analyse von Modulatoren der Melanomentstehung und -progression anhand eines murinen Modellsystems



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät III für Biologie und Vorklinische Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Susanne Schiffner

aus

Schrobenhausen

im Februar 2012

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 07.02.2012

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: PD Dr. Rudolf Fuchshofer

1. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

2. Gutachterin: Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff

3. Prüfer: Prof. Dr. Richard Warth

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	4
2.1	Das maligne Melanom.....	4
2.1.1	Definition	4
2.1.2	Klassifikation	4
2.1.3	Inzidenz und Risikofaktoren	5
2.1.4	Pathogenese des Melanoms	6
2.1.5	Prognose.....	8
2.1.6	Grundlagen der Melanom-Entstehung und -Progression.....	9
2.1.7	Mausmodelle in der Melanomforschung	19
2.2	<i>Melanoma Inhibitory Activity (MIA)</i>.....	23
2.2.1	Die MIA-Proteinfamilie.....	23
2.2.2	Genomische Lokalisation und Proteinstruktur	24
2.2.3	Die Bedeutung von MIA im malignen Melanom	24
2.2.4	Das MIA- <i>knockout</i> Mausmodell.....	25
2.3	<i>Bone-morphogenetic protein 6 (BMP6)</i>	26
2.3.1	Die BMP-Proteinfamilie	26
2.3.2	Funktion und Bedeutung von BMPs	27
2.3.3	Die Bedeutung von BMPs im malignen Melanom.....	28
2.3.4	Das BMP6- <i>knockout</i> Mausmodell.....	29
2.4	Verfettung und Tumorgenese.....	30
2.4.1	Risikofaktoren für maligne Erkrankungen	30
2.4.2	Übergewicht und Krebsrisiko.....	31
2.4.3	Ursachen für erhöhtes Krebsrisiko bei Übergewicht	32
2.4.4	Übergewicht und Metastasierung von Tumoren	33
2.5	Zielsetzung	35
3	Materialien und Methoden.....	36
3.1	Materialien	36

3.1.1	Allgemeine Materialien	36
3.1.2	Geräte	38
3.1.3	Primäre Zellen und Tumorzelllinien	41
3.1.4	Gewebeproben.....	42
3.1.5	Säugetiere.....	42
3.1.6	Antikörper und rekombinante Proteine	43
3.1.7	Oligonukleotide	45
3.1.8	Medien, Puffer, Lösungen und Antibiotika	47
3.2	Methoden	51
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	51
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	54
3.2.3	Zellkulturmethoden.....	58
3.2.4	Arbeiten mit Mäusen	62
3.2.5	Statistik	65
4	Ergebnisse	66
4.1	Nähere Charakterisierung des Grm1-transgenen Melanom-Mausmodells	66
4.1.1	Dokumentation von Tumorentstehung und -progression	67
4.1.2	Unpigmentierte disseminierte Melanomzellen im Grm1-Modell	68
4.1.3	Isolierung und Charakterisierung einer immortalen melanozytären Zelllinie aus der Grm1-transgenen Maus.....	73
4.2	<i>In vivo</i> Untersuchungen zur Rolle von MIA in der Melanomentstehung	78
4.2.1	Etablierung einer MIA-defizienten Grm1-transgenen Mauslinie	79
4.2.2	Vergleichende Analyse von Tumorentstehung und Progression.....	80
4.2.3	Ursache des beschleunigten Melanomwachstums bei Grm/MIA-/- Mäusen	84
4.2.4	MIA und Seneszenz in Melanomzellen.....	89
4.3	<i>In vivo</i> Untersuchung zur Rolle von BMP6 in der Melanomentstehung und -progression.....	91
4.3.1	Expression von BMP6 im malignen Melanom	91
4.3.2	Züchtung einer BMP6-defizienten Grm1-transgenen Mauslinie	93

4.3.3	Der Einfluss von BMP6 auf die Tumorentstehung und Progression im Mausmodell	95
4.3.4	Die Wirkung von BMP6 in der Melanomentstehung	99
4.4	Der Einfluss von Verfettung auf die Entstehung und Progression des malignen Melanoms	101
4.4.1	Auswirkungen der Paigen-Diät beim Grm1-Mausmodell	101
4.4.2	Der Einfluss von Verfettung auf die Melanomentstehung im Grm1/Paigen Modell	103
4.4.3	Leberverfettung und Metastasierung von Melanomzellen.....	104
4.4.4	Zusammenhang zwischen Leberfibrose und Metastasierung	108
5	Diskussion	110
5.1	Nähere Charakterisierung und neue Erkenntnisse über das Grm1-transgene Mausmodell.....	110
5.1.1	Grading-System zur eindeutigen Beschreibung des primären Melanomwachstums bei Grm1-transgenen Mäusen	111
5.1.2	Grm1-transgene Mäuse weisen zahlreiche unpigmentierte Melanommetastasen in peripheren Organen auf	111
5.1.3	Eine immortale melanozytäre Zelllinie aus der Grm1-transgenen Maus als neues Zellkulturmodell.....	114
5.2	Die kontroverse Rolle des Onkogens MIA im malignen Melanom	116
5.2.1	MIA-defizienten Melanommäuse weisen ein beschleunigtes Melanomwachstum auf	116
5.2.2	MIA spielt eine Rolle in der Seneszenz von humanen Melanozyten und Melanomzellen	118
5.2.3	MIA fördert die Metastasierung von Melanomzellen <i>in vivo</i>	121
5.3	BMP6 spielt eine wichtige Rolle in der frühen Melanomentstehung	123
5.3.1	BMP6 ist im malignen Melanom verstärkt exprimiert	123
5.3.2	Verzögerte Melanomentstehung in Grm1/BMP6-/- Mäusen.....	124
5.3.3	BMP6 hat <i>in vivo</i> keinen Einfluss auf Metastasierung.....	125
5.3.4	BMP6 fördert einen dedifferenzierten Phänotyp bei Melanozyten	126

5.4	Verfettung fördert die Entstehung und Progression des malignen Melanoms	128
5.4.1	Leberverfettung fördert die Entstehung des malignen Melanoms	129
5.4.2	Verfettung verstärkt die Metastasierungsrate bei Grm1-transgenen Mäusen	130
6	Literaturverzeichnis.....	133
7	Eigene Publikationen	147
8	Anhang	148
8.1	Abkürzungsverzeichnis	148
8.2	Danksagung.....	151
8.3	Erklärung	152

1 Zusammenfassung

Das Grm1-transgene Mausmodell (Tg(*Grm1*)EPv) zeichnet sich durch die spontane Entstehung von malignen Melanomen an den unbehaarten Hautregionen mit 100% Penetranz aus. Es eignet sich daher besonders gut, um den Einfluss bestimmter Faktoren auf die frühe Entstehung des malignen Melanoms aus prä-malignen Vorstufen zu untersuchen. Anhand dieses Mausmodells wurden in der vorliegenden Arbeit die Rolle von MIA, BMP6 und von Verfettung auf die Entstehung und Progression des Melanoms untersucht.

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten erfolgte eine intensive Beobachtung und Charakterisierung der Grm1-transgenen Mäuse. Bisher wurden bei diesem Mausmodell lokale Metastasen im umgebenden Muskelgewebe sowie in den nahen Lymphknoten, jedoch keine Fernmetastasierung beschrieben. In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal disseminierte Melanomzellen in peripheren Organen wie Milz, Lunge und Leber nachgewiesen werden. Hierfür wurde ein sensitiver immunhistochemischer Nachweis etabliert. Die Mehrzahl der disseminierten Melanomzellen wies dabei einen stark dedifferenzierten Phänotyp auf. Des Weiteren konnten bereits in sehr frühen Stadien disseminierte Melanomzellen im Knochenmark nachgewiesen werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass es beim Tg(*Grm1*)EPv-Mausmodell, entgegen der bisherigen Befunde, zur Fernmetastasierung kommt. Zudem konnte aus der Haut von Grm1-Mäusen eine stark dedifferenzierte immortale Zelllinie melanozytären Ursprungs generiert werden, welche nach der weiteren Charakterisierung ein interessantes Zellkulturmodell für künftige Studien am Melanom darstellen wird.

Es ist bekannt, dass MIA (*melanoma inhibitory activity*) im Melanom überexprimiert vorliegt und die Metastasierung von Melanomzellen und damit die Tumorprogression fördert. Weitere Daten weisen eindeutig darauf hin, dass MIA auch in der frühen Melanomentstehung eine Rolle spielt. Dieser Aspekt wurde im ersten Teilabschnitt der vorliegenden Arbeit untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wiesen MIA-defiziente Grm1-Mäuse ein deutlich verfrühtes Melanomwachstum auf. Weitere

Analysen an humanen Melanozyten (NHEM) zeigten, dass dieser Effekt vermutlich auf Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) zurückzuführen war. Dabei konnte gezeigt werden, dass die MIA-Expression in NHEM mit Seneszenz korreliert. Durch die Herabregulation von MIA wurde der Anteil an seneszenten Zellen sowie die Expression des Zellzyklus-Inhibitors p21/CIP1 signifikant verringert, gleichzeitig wurde die Proliferationsaktivität deutlich erhöht. In der Melanomzelllinie HMB2 konnte eine seneszente Population nachgewiesen werden, diese war in MIA-defizienten HMB2-MIA5 Zellen nicht mehr detektierbar. Diese Daten zeigen, dass MIA in den Mechanismus der Seneszenz involviert ist. In der frühen Melanomentstehung wirkt MIA eher antiproliferativ, im Zuge der Tumorprogression wird die MIA-induzierte Seneszenz durch bislang unbekannte Mechanismen inhibiert. Zudem konnte durch diese Analysen auch *in vivo* bestätigt werden, dass MIA die Metastasierung von Melanomzellen fördert.

BMPs spielen in zahlreichen Tumorarten eine bedeutende Rolle, im Melanom konnte dies bereits für die BMPs 2, 4 und 7 gezeigt werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle von BMP6 in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms analysiert. Expressionsanalysen zeigten eine verstärkte Expression von BMP6 in humanen Melanomzelllinien und humanen Geweben im Vergleich zu NHEM und Normalhaut. Auch in humanen Nävusproben konnte keine BMP6-Expression detektiert werden. *In vivo* wiesen BMP6-defiziente Grm1-Mäuse, im Vergleich zur Kontrollgruppe, ein extrem verzögertes Melanomwachstum auf. Auf die nähere und periphere Metastasierung hatte BMP6 jedoch keinen Einfluss. Durch *in vitro* Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass BMP6 keinen Einfluss auf Proliferation, Migration und das Matrix-unabhängige Wachstum von humanen Melanomzelllinien hat. Auf normalen Melanozyten zeigte BMP6 jedoch eine dedifferenzierende Wirkung. Expressionsanalysen zeigten eine deutliche BMP6-Expression in dedifferenzierten Melanoblasten-ähnlichen Zellen, im Vergleich zu NHEM. Insgesamt konnte zum ersten Mal *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass BMP6 im Melanom verstärkt exprimiert und an der frühen Melanomentstehung wesentlich beteiligt ist.

Es ist inzwischen bekannt, dass ein erhöhter Körperfettanteil die Entstehung von zahlreichen malignen Tumoren fördert. Auch für das maligne Melanom gibt es darauf epidemiologische Hinweise. Dieser Aspekt wurde im dritten Teil der vorliegenden Arbeit anhand des Grm1-transgenen Mausmodells untersucht. Dabei wiesen Grm1-transgene Mäuse bei erhöhter Leber- und Körperversfettung ein signifikant früheres Tumor-onset sowie eine deutlich verstärkte Tumorprogression auf. Zudem konnten sowohl in der Lunge als auch in der Leber signifikant mehr metastasierte Melanomzellen nachgewiesen werden. Die Anzahl der disseminierten Melanomzellen in der Leber korrelierte dabei mit der Stärke der Lebersfettung und der Fibrose. Mit diesen Daten konnte zum ersten Mal *in vivo* gezeigt werden, dass die Melanomentstehung bei einer bestehenden genetischen Prädisposition durch Verfettung signifikant beschleunigt wird. Des Weiteren wurde die Metastasierungsrate durch die bestehende Verfettung massiv erhöht, was einen entscheidenden Aspekt für eine erfolgreiche Melanomtherapie darstellt.

2 Einleitung

2.1 Das maligne Melanom

2.1.1 Definition

Das maligne Melanom (schwarzer Hautkrebs) ist ein bösartiger Hauttumor, der aus den pigmentbildenden Zellen der Haut, den Melanozyten, hervorgeht. Neben der Haut und den Schleimhäuten kann es selten auch im Auge (Retina und Uvea) und an den Hirnhäuten auftreten. Wird ein malignes Melanom frühzeitig erkannt und durch Exzision entfernt, ist in etwa 80% der Fälle eine vollständige Heilung möglich. Da es jedoch bereits bei einer geringen Größe des Primärtumors zur Metastasierung kommt und der Tumor in diesem Stadium weitgehend resistent gegen die verfügbaren Therapien ist, sinkt die Überlebensrate auf durchschnittlich sechs Monate. Die 5-Jahres Überlebensrate eines Patienten mit metastasiertem Melanom beträgt weniger als 5% (Cummins, et al., 2006). Das Melanom zählt dadurch zu den hochmalignen Tumoren und ist für etwa 90% der Todesfälle durch Hauttumoren verantwortlich (Miller, et al., 2006; Russo, et al., 2009).

2.1.2 Klassifikation

Klinisch und histopathologisch werden vier Melanom-Subtypen unterschieden. Des Weiteren gibt es mit einem Anteil von ca. 5% nicht eindeutig klassifizierbare Varianten oder Mischformen sowie seltene Varianten. Das am häufigsten auftretende Melanom ist mit einem Anteil von 59% das **superfiziell spreitende Melanom (SSM)**. Es wird in Deutschland mit einem Durchschnittsalter von 54 Jahren diagnostiziert. Charakteristisch für das SSM ist eine unregelmäßige, aber scharfe Begrenzung. Der Tumor weist häufig unterschiedliche Verfärbungen von schwarz-braun bis rötlich und auch grau auf. Das superfiziell spreitende Melanom breitet sich zunächst relativ langsam an der Hautoberfläche aus, später kann es auch knotenartige Geschwüre bilden. Bei frühzeitiger Diagnose bestehen gute Heilungschancen. Einen Anteil von

21% bildet das **noduläre Melanom (NM)**, welches durchschnittlich mit einem Alter von 59 Jahren auftritt. Dieser Tumor zeichnet sich durch sein primär vertikales und insgesamt schnelles Wachstum aus. Er ist knotig, scharf begrenzt und meist unterschiedlich pigmentiert. Häufig bilden sich an der Oberfläche Ulzerationen. Durch das schnelle vertikale Wachstum hat das noduläre Melanom die schlechteste Prognose. Das **Lentigo-maligna-Melanom (LLM)** hat einen Anteil von 11% und tritt mit einem Durchschnittsalter von 69 Jahren auf. Form, Größe und Pigmentierung können stark variieren. Die Tumorränder können sowohl scharf als auch unscharf begrenzt sein. Das LLM tritt vermehrt an sonnenexponierten Hautstellen wie dem Gesicht und an den Händen auf. Das **akral-lentiginöse Melanom (ALM)** bildet mit einem Anteil von 4% die kleinste Gruppe der vier Subtypen. Dabei handelt es sich um einen unregelmäßig pigmentierten Hauttumor, der mit einem durchschnittlichen Alter von 65 Jahren diagnostiziert wird. Das ALM tritt vor allem an den Handinnenflächen, den Füßen sowie an den Schleimhäuten auf (Garbe, et al., 2009).

2.1.3 Inzidenz und Risikofaktoren

Das Risiko, am malignen Melanom zu erkranken, ist in den letzten Jahrzehnten weltweit rasant gestiegen und nach neuesten Erhebungen hält dieser Trend weiterhin an. In Mitteleuropa und in den USA wurde zwischen 1970 und 2000 eine Verdreifachung der Neuerkrankungen pro Jahr dokumentiert. Während 1970 in Mitteleuropa noch jährlich drei bis vier Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner auftraten, waren es im Jahr 2000 bereits 10 bis 15 Fälle. In den USA wurden für diesen Zeitraum ähnliche Inzidenzzahlen registriert. In Australien und Neuseeland ist die Inzidenz des Melanoms mit 30 bis 60 neuen Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr weltweit am höchsten, unter anderem bedingt durch die besonders hohe UV-Strahlung. Innerhalb Europas sind die skandinavischen Länder durchschnittlich am Stärksten betroffen, was unter anderem durch den vergleichsweise hellen Hauttyp zu erklären ist. Es wird angenommen, dass sich die weltweite Inzidenzrate jährlich durchschnittlich um 3-7% erhöht, was einer Verdopplung alle 10 bis 20 Jahre entsprechen würde. Damit ist das maligne Melanom die am stärksten zunehmende maligne Erkrankung der weißen Bevölkerungsgruppe (Garbe, et al., 2009).

Das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt beim malignen Melanom etwa 55-60 Jahre. Dies bedeutet, dass etwa die Hälfte der Patienten jünger als 55 Jahre ist. Frauen sind in Deutschland durchschnittlich etwas häufiger betroffen als Männer. Auch in der Lokalisation der Primärtumore gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede. Bei Frauen entwickeln sich Melanome mit 42% vor allem an den unteren Extremitäten, davon 24% am Unterschenkel. Etwa 25% der Melanome sind am Rumpf lokalisiert. Bei Männern bilden sich Melanome mit einem Anteil von 55% hauptsächlich am Rumpf, davon entstehen 39% am Rücken (Garbe, et al., 2009).

Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines malignen Melanoms sind blonde oder rötliche Haarfarbe, ein heller Hauttyp sowie eine erhöhte Anzahl an benignen („Muttermale“) oder atypischen Nävi. Bei einer persönlichen oder familiären Vorbelastung durch Melanome besteht ebenfalls ein erhöhtes Risiko am Melanom zu erkranken bzw. ein weiteres Melanom zu entwickeln. Eine intensive Exposition mit ultraviolettem (UV) Licht sowie die Anzahl der im Laufe des Lebens erlittenen Sonnenbrände gilt als weiterer bedeutender Risikofaktor. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig geklärt, da Melanome häufig auch an wenig sonnenexponierten Stellen auftreten (MacKie, et al., 2009; Holly, et al., 1987). Für eine große Anzahl von Tumorarten ist inzwischen bekannt, dass eine ungünstige Lebensweise und Übergewicht das Risiko für maligne Erkrankungen deutlich erhöht. Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass dies auch für das maligne Melanom zutrifft (siehe 2.4). Dieser Aspekt wurde in einem Teil der vorliegenden Arbeit näher untersucht (siehe 4.4).

2.1.4 Pathogenese des Melanoms

Das sogenannte „Clark-Modell“ beschreibt die Entstehung maligner Melanome in fünf Stufen unter Berücksichtigung histopathologischer Merkmale (Clark, et al., 1984): Der erste Schritt ist ein vermehrtes Wachstum von normalen Melanozyten, was in einem **benignen Nävus** resultiert. Die anfängliche Hyperproliferation wird durch die Induktion von Seneszenz gestoppt. Charakteristisch für Nävi sind Ansammlungen normaler Melanozyten an der Basalmembran. Aus benignen Nävi entwickeln sich selten direkt Melanome. Die nächste Stufe, der **dysplastische Nävus**, gilt als

Vorstufe des Melanoms. Er entsteht durch anormales Wachstum von Melanozyten und kann aus einem bereits vorhandenen benignen Nävus oder auf bisher unauffälliger Haut entstehen. Charakteristisch für dysplastische Nävi sind eine asymmetrische Form, unscharfe Ränder und unterschiedliche Verfärbungen. Der Übergang zur malignen Läsion ist durch die **radiale Wachstumsphase (radial-growth phase, RGP)** gekennzeichnet. In diesem Stadium breiten sich die Tumorzellen radial in der Epidermis aus, es finden sich durchgehend atypische Zellen. Vereinzelt können Melanomzellen die Basalmembran durchbrechen, sind aber noch nicht fähig, in die tiefere Dermis einzudringen. Im Gegensatz hierzu sind Melanome in der **vertikalen Wachstumsphase (vertical growth phase, VGP)** in der Lage, in die Dermis und das Fettgewebe zu wandern und dort durch unkontrollierte Proliferation weitere Tumornester auszubilden (Abbildung 2-1). Im letzten Schritt erlangen die Melanomzellen die Fähigkeit, in umliegende Hautareale und andere Organe einzuwandern und dort Metastasen auszubilden. Das **metastasierende Melanom** ist fähig, sich sowohl lymphatisch als auch über die Blutgefäße im Körper auszubreiten und in andere Gewebe einzuwandern.

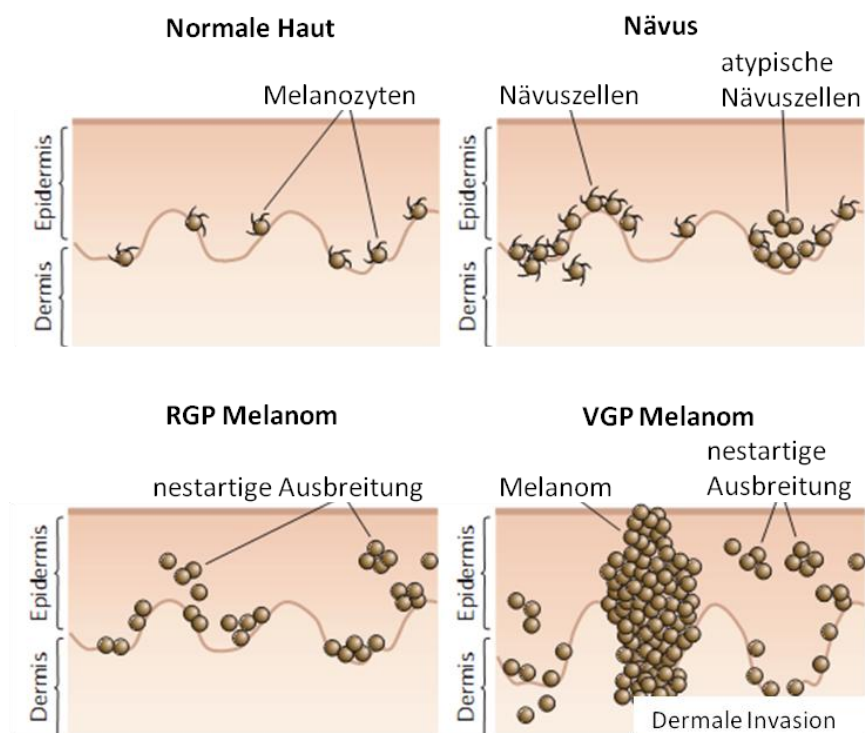


Abbildung 2-1: Stufen der Melanomentstehung (Gray-Schopfer, et al., 2007) (modifiziert).

In den meisten Fällen entstehen Melanome nach dem beschriebenen 5-Stufenmodell. Es kann aber auch Abweichungen geben, indem manche Schritte „übersprungen“ werden. In seltenen Fällen entwickeln sich Melanome auch direkt aus Melanozyten oder benignen Nävi. Eine weitere Ausnahme bilden sogenannte congenitale Nävi, die bereits bei der Geburt vorhanden sind und sehr groß sein können. Es besteht ein erhöhtes Risiko, ein Melanom direkt aus einem congenitalen Nävus zu entwickeln (Tannous, et al., 2005).

2.1.5 Prognose

Die Prognose des malignen Melanoms hängt von den oben genannten Entwicklungsstadien und vom Melanom-Subtyp (siehe 2.1.2 und 2.1.4) ab. Schnell in die Vertikale wachsende Melanome wie das noduläre Melanom haben grundsätzlich eine schlechtere Prognose als langsam proliferierende Tumore. Die Beurteilung von Malignität und Prognose erfolgen anatomisch und histologisch nach Dicke des Primärtumors (Methode nach Breslow), Eindringtiefe in die unteren Hautschichten (Clark-Level) sowie nach der Anzahl von Metastasen in Lymphknoten und Organen (Breslow, 1970; Breslow, 1977; Geelhoed, et al., 1977; Clark, et al., 1969). Für die Bestimmung der maximalen Tumordicke nach Breslow wird der vertikale Abstand zwischen dem *stratum granulosum* in der Epidermis und der am tiefsten eingedrungenen Tumorzelle bestimmt. Ist die Tumordicke $\leq 1\text{mm}$ (Breslow-Index I) und die Lokalisation der Tumorzellen rein epidermal (Clark-Level I), liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei über 90%. Es bestehen gute Heilungschancen durch die chirurgische Entfernung des Primärtumors. Mit steigendem Breslow-Index und Clark-Level sinkt die prozentuale Fünf-Jahres-Überlebensrate jedoch dramatisch: Bei einem mit Clark-Level II beurteiltem Melanom beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate 70%, bei Level III nur noch etwa 40%. Lassen sich in der untersten Schicht der Dermis (*stratum reticulare*) bereits Tumorzellen nachweisen, spricht man von Clark-Level IV. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt in diesem fortgeschrittenen Stadium nur noch weniger als 10%. Das Melanom gilt als hochmaligner Tumor, da bereits ab der geringen Tumordicke von 1mm die Gefahr von Metastasierung besteht. Das große Problem ist nach wie vor, dass bereits

metastasierende Melanome hochresistent gegen die verfügbaren Chemo-, Immun- und Radiotherapien sind. Eine vollständige Heilung ist daher nur im Anfangsstadium möglich und somit eine frühe Diagnose für das Überleben besonders entscheidend.

2.1.6 Grundlagen der Melanom-Entstehung und -Progression

Grundlage für die Entstehung eines malignen Melanoms ist die Entartung (Transformation) von Melanozyten und das damit verbundene gestörte Gleichgewicht zwischen Proliferation, Differenzierung, Seneszenz und Apoptose. In der normalen Haut sitzen epidermale Melanozyten zwischen den Zellen der Basalzellschicht auf der Basalmembran, welche die Epidermis von der darunterliegenden Dermis abgrenzt. Über ihre zahlreichen dendritischen Ausläufer versorgen sie die Keratinozyten mit dem Pigmentfarbstoff Melanin, der sich um den Zellkern lagert und die DNA vor der Schädigung durch UV-Strahlung schützt. Proliferationsverhalten, Differenzierung, Überleben und Mobilität der Melanozyten stehen in der Normalhaut unter Kontrolle der umgebenden Keratinozyten. Bei dieser Regulation spielt zum einen die direkte Interaktion über Zell-Zell-Kontakte eine wichtige Rolle. Zum anderen beeinflussen die Keratinozyten Wachstum und Differenzierung von Melanozyten auf parakrine Weise durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren. Wird dieses regulatorische Gleichgewicht gestört, können Melanozyten unabhängig von Keratinozyten proliferieren, migrieren und überleben. Es kommt zur Entstehung von melanozytären Läsionen (benigne Nävi) oder malignen Melanomen. Die Ursachen hierfür sind zum einen angeborene und erworbene Mutationen. Zum anderen kommt es während der Melanomentstehung zur Fehlregulation von zahlreichen wichtigen Molekülen und Signalwegen, die nicht nur das Tumorwachstum sondern auch die Progression fördern. Im folgenden Abschnitt werden die für die vorliegende Arbeit relevanten Mutationen und molekularen Veränderungen, die zur Melanomentstehung und -progression beitragen, kurz erörtert.

2.1.6.1 Wichtige Mutationen in der Melanomentstehung

Wichtige und frühe Ereignisse in der Transformation von Melanozyten sind angeborene oder durch exogene Faktoren erworbene Mutationen, wodurch

Onkogene aktiviert und wichtige Tumorsuppressoren abgeschaltet werden. Hierfür gibt es verschiedene Ursachen, als größter Risikofaktoren gelten jedoch nach wie vor die erhöhte Exposition mit UV-Licht sowie häufig erlittene Sonnenbrände. Durch die dabei entstehenden DNA-Schäden und aufgrund eines häufig defekten DNA-Reparatursystems kommt es zur Anhäufung von Mutationen. Da Melanome jedoch auch an nicht-sonnenexponierten Hautstellen auftreten, ist UV-Licht ein bedeutender Faktor, jedoch nicht die alleinige Ursache für Mutationen.

Der Genlocus **CDKN2A** ist im Melanom mit 30-70% besonders häufig von genetischen Veränderungen betroffen. Allein bei den familiär bedingten Melanomen finden sich in 20-40% der Fälle deletierende Mutationen von *CDKN2A*. Aber auch spontan entstandene Melanome weisen sehr häufig somatische Mutationen oder weitere genetische Veränderungen von *CDKN2A* auf. Dabei kommt es meist durch Punktmutationen, Deletionen oder Promotor-Hypermethylierung zur Inaktivierung von *CDKN2A* (Abbildung 2-2). *CDKN2A* kodiert für die Tumorsuppressoren p14/ARF und p16/INK4A, wichtige Kontrollmoleküle des Zellzyklus. P16/INK4A inhibiert die Einleitung des Zellzyklus, da durch Bindung an den CDK4/6 (*cyclin-D1-dependent kinase*)-Komplex die Phosphorylierung des RB (Retinoblastom, pRB)-Proteins und die Aktivierung des E2F Transkriptionsfaktors unterbunden wird. Kommt es durch Mutationen zum Verlust von p16/INK4A, wird der Zellzyklus über das konstitutiv aktive RB-Protein und die Aktivierung von E2F unkontrolliert fortgesetzt. P14/ARF, das zweite Genprodukt des *CDKN2A* Locus, wirkt inhibierend auf MDM2 (*murine double minute*). Dadurch wird der Tumorsuppressor p53 nicht abgebaut und der Zellzyklus über p21/CIP1 und den CDK2 (*cyclin-E1-dependent kinase*)-Komplex gestoppt. Kommt es zum Verlust von p14/ARF, wird über den Abbau von p53 und die Aktivierung des CDK2-Komplexes der Zellzyklus induziert. Dies trägt in transformierten Melanozyten zur unkontrollierten Proliferation und damit zur Tumorprogression bei. Da p53 zudem ein wichtiger Regulator des DNA-Reparatursystems ist, kommt es durch den Verlust von p14/ARF zur Anhäufung von DNA-Schäden bei gleichzeitig aktiviertem Zellzyklus. Die resultierenden Aberrationen in den Tochterzellen begünstigen die Progression des Tumorwachstums (Quelle, et al., 1995; Piepkorn, 2000; Levine, 1997; Box, et al., 2008). P14/ARF und p16/INK4A sind außerdem Vermittler der Onkogen-induzierten Seneszenz, einem wichtigen

Schutzmechanismus vor vollständiger maligner Entartung (siehe 2.1.6.3). Sind diese beispielsweise durch Mutationen inaktiviert, können prä-maligne Zellen die Seneszenz umgehen und unkontrolliert proliferieren.

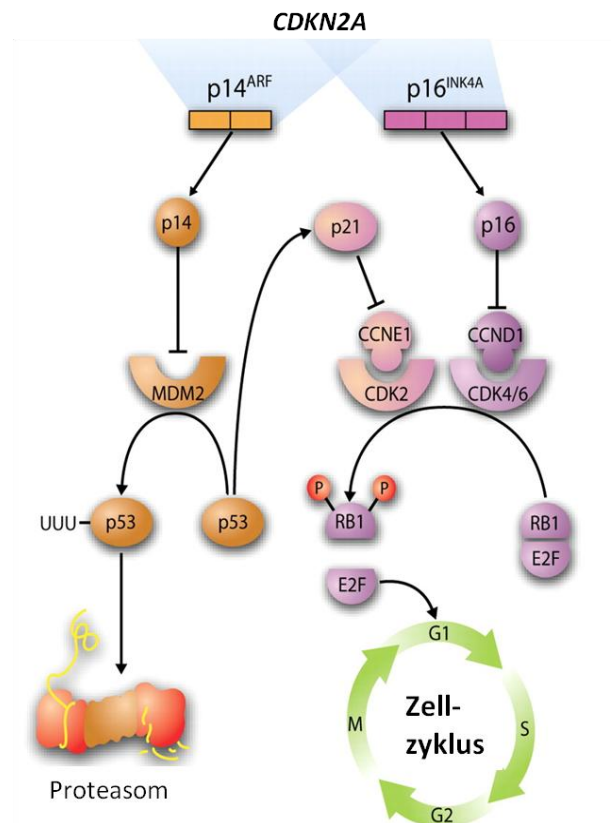


Abbildung 2-2: Der *CDKN2A* Genlokus und seine Verknüpfung mit dem Zellzyklus: *CDKN2A* kodiert für die Tumorsuppressoren p16/INK4A und p14/ARF. P14 inhibiert über MDM2 den Ubiquitin-vermittelten Abbau von p53. Dadurch wird der CDK2-Komplex über p21 inhibiert, es erfolgt kein Einleiten des Zellzyklus über E2F. Durch p16 wird der CDK4-Komplex inaktiviert und eine Phosphorylierung des RB1-Proteins verhindert. Dadurch bleibt der RB-E2F-Komplex erhalten und der Zellzyklus inaktiv (Sekulic, et al., 2008)(modifiziert).

In über 90% der Melanomerkrankungen ist der **MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Signalweg** konstitutiv aktiv. Dieser ist einer der Hauptsignalwege der Zelle, da er grundlegende Prozesse wie Proliferation, Überleben, Differenzierung, Zelladhäsion und Migration vermittelt (Abbildung 2-3). Durch aktivierende Mutationen werden Zielgene wie Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren vermehrt exprimiert. Die Folgen sind unkontrolliertes Zellwachstum, Apoptose-Resistenz und

erhöhte Migration. Für die Aktivierung des MAPK-Signalweges sind im Melanom zu 50-70% mutierte B-RAF Moleküle verantwortlich. Hierbei handelt es sich in über 90% der Fälle um das B-RAF(V600E) Onkogen (Austausch von Valin durch Glutaminsäure an Position 600) auf (Davies, et al., 2002). Bei 15-30% der Melanome führt mutiertes N-RAS zur konstitutiven Aktivierung des MAPK-Weges. Interessanterweise treten N-RAS und B-RAF-Mutationen im Melanom äußerst selten in Kombination auf (Goel, et al., 2006). B-RAF oder N-RAS Mutationen finden sich bereits in etwa 80% der benignen Nävi, daher spielt der MAPK-Signalweg in der Melanomentstehung vermutlich sehr früh eine wichtige Rolle. Seine Aktivierung ist aber noch nicht ausreichend für eine vollständige maligne Entartung, da durch die Induktion von Seneszenz das weitere Zellwachstum gestoppt wird (siehe 2.1.6.3) (Pollock, et al., 2003; Palmieri, et al., 2009).

Der MAPK-Signalweg ist über RAS und PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) mit dem **PI3K/AKT-Signalweg** (Abbildung 2-3) verknüpft. Aktiviertes RAS-Protein interagiert dabei mit der PI3K. Über die Aktivierung von AKT wird die Induktion von Apoptose unterbunden und somit das Überleben der Zelle gefördert. Als wichtiges regulatorisches Element fungiert hierbei der Tumorsuppressor PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*). Dieser ist in etwa 5-20% der Melanome durch Mutationen inaktiviert. Die Folge hiervon ist die Akkumulation von aktiviertem AKT3 und damit ein konstitutiv aktiver PI3K/AKT-Signalweg. In etwa 40-60% der Melanome tritt zudem eine verstärkte Expression von AKT als Folge aktivierender Mutationen auf. Die erhöhte Aktivität von AKT sowie die fehlende negative Regulation durch PTEN führen zur dauerhaften Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges und damit zur unkontrollierten Aktivierung von Zielgenen. Im Melanom tritt der Verlust von PTEN sehr häufig in Kombination mit mutiertem B-RAF auf. Die Folgen sind verstärktes Tumorstadium und Progression aufgrund erhöhter Proliferation, Überleben und Migration (Tamura, et al., 1998; Stahl, et al., 2004; Haluska, et al., 2006).

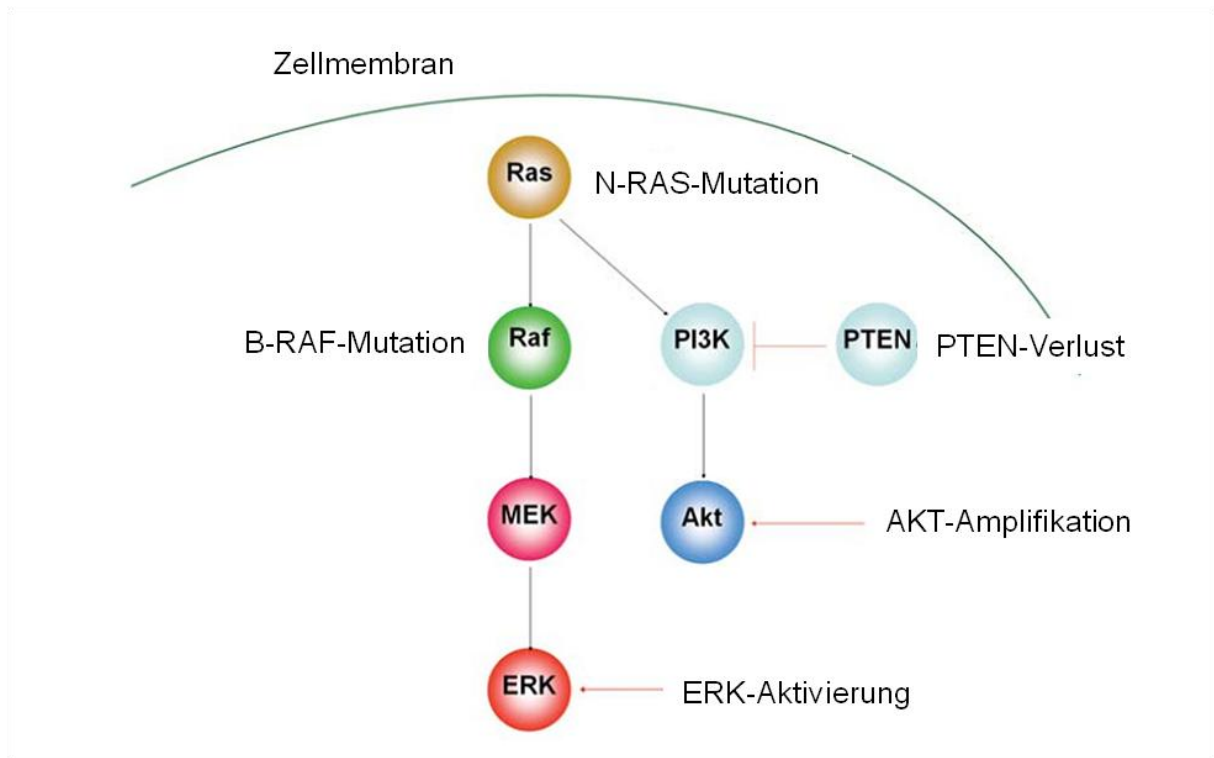


Abbildung 2-3: Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg und die wichtigsten Mutationen im malignen Melanom (Russo, et al., 2009) (modifiziert).

2.1.6.2 Wichtige fehlregulierte Moleküle im Melanom

Neben der Aktivierung von Onkogenen oder dem Verlust von Tumorsuppressoren als Folge von Mutationen kommt es bei der Melanomentstehung außerdem zur Fehlregulation zahlreicher Moleküle. Dabei handelt es sich zum einen um Veränderungen im Expressionsmuster der Adhäsionsmoleküle, zum anderen werden verstärkt tumorfördernde Wachstumsfaktoren und Zytokine sezerniert, die für das Wachstum und Überleben der Tumorzellen wichtig sind.

Ein frühes und besonders kritisches Ereignis in der Melanomentstehung und auch in der Tumorprogression ist die Veränderung am Expressionsmuster der **Adhäsionsmoleküle**. Transformierende Melanozyten und Melanomzellen weisen eine verringerte Expression von E-Cadherin auf, gleichzeitig wird N-Cadherin verstärkt an der Zelloberfläche exprimiert. Da epidermale Zellen ausschließlich E-Cadherin exprimieren, stehen N-Cadherin-exprimierende Melanomzellen nicht mehr

unter der Kontrolle der Keratinozyten. Dadurch wird einerseits unkontrolliertes Wachstum, andererseits auch die Interaktion mit weiteren Melanomzellen, dermalen Fibroblasten und Endothelzellen ermöglicht. Die Melanomzellen können dadurch in den tieferen Hautarealen und Geweben überleben und weitere Tumornester ausbilden (Haass, et al., 2004; Hsu, et al., 2000; Hsu, et al., 1996; Miller, et al., 2006). Adhäsionsmoleküle vermitteln nicht nur Zell-Zell-Kontakte, sie sind auch an der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt. Durch den Verlust von E-Cadherin wird zusätzlich die Expression zahlreicher Melanom-assoziiierter Faktoren induziert, die zu Proliferation und Überleben der Tumorzellen in Geweben außerhalb der Epidermis beitragen (Russo, et al., 2009).

Des Weiteren sind zahlreiche sezernierte Faktoren fehlreguliert und fördern dadurch sowohl die Melanomentstehung als auch die Progression des Tumors. Bereits in den frühen Phasen werden verstärkt **Wachstumsfaktoren** wie bFGF (*basic fibroblast growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*) und SCF (*stem cell factor*) ausgeschüttet. Ein Auslöser hierfür ist unter anderem die erhöhte Exposition mit UV-Licht. Die daraus resultierende autokrine und parakrine Stimulation führt zur vermehrten melanozytären Proliferation und zum Wachstum von Tumorzellen (Li, et al., 2002; Gray-Schopfer, et al., 2007). Im Melanom sind außerdem die Wachstumsfaktoren TGF β (*transforming growth factor beta*) sowie einige Mitglieder der **BMP (bone-morphogenetic proteins)**-Proteinfamilie fehlreguliert. Die BMPs 4 und 7 sind im Melanom überexprimiert und in die Tumورprogression involviert (siehe 2.3.3). Über die Rolle der weiteren Mitglieder der BMP-Proteinfamilie im Melanom ist bis *dato* nichts bekannt. Die Rolle von BMP6 in der Melanomentstehung und -progression ist Gegenstand eines Teiles der vorliegenden Arbeit (siehe 4.3).

Während der Tumورprogression werden neben HGF, bFGF und TGF β weitere **pro-invasive Faktoren** wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) aktiviert. Dadurch wird das Wachstum von Endothelzellen und damit die Neubildung von Blut- und Lymphgefäßen zum Tumor hin gefördert (Mahabeleshwar, et al., 2007; Gaggioli, et al., 2007). Im Vergleich zu normalen Melanozyten sezernieren Melanomzellen aus Primärtumoren und Metastasen große Mengen des Proteins **MIA (*melanoma inhibitory activity*)**. MIA bindet an Integrine und Komponenten der extrazellulären

Matrix, wodurch das Lösen der Melanomzelle aus dem Tumorverband und damit die Metastasierung gefördert wird (siehe 2.2) (Bosserhoff, et al., 2003; Schmidt, et al., 2010). Es gibt aber auch Hinweise, dass MIA bereits in der frühen Melanomentstehung eine wichtige Rolle spielt. Dieser Punkt wurde in einem Teil der vorliegenden Arbeit näher untersucht (siehe 4.2).

2.1.6.3 Die Rolle von Seneszenz in der Melanomentstehung

2.1.6.3.1 Definition und Kennzeichen von Seneszenz

Unter **replikativer Seneszenz** versteht man einen Mechanismus, der nach einer bestimmten Anzahl von Teilungen, oder aufgrund von irreparablen DNA-Schäden aktiviert wird, um weitere Zellteilungen zu unterbinden. Durch die Aktivierung von Zellzyklus-Inhibitoren wird die Zellteilung unterbrochen und die Zelle verbleibt in der G0-Phase („proliferativer Arrest“) (Hayflick, 1965). Charakteristisch für senescente Zellen ist die vermehrte Expression von Tumorsuppressoren wie p14/ARF, p15/INK4B, p16/INK4A, p21/CIP, p27/KIP1, p53 und RB-Protein sowie die Aktivierung von Seneszenz-assoziiierter β -Galaktosidase (SA- β -Galaktosidase). Senescente Zellen weisen eine ausgebreitete Morphologie auf, sind häufig vakuolisiert und mehrkernig. Im Chromatin lassen sich zudem Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci (SAHF) sowie spezielle Histon-Modifikationen nachweisen (Dimri, et al., 1995; Narita, et al., 2003). Seneszenz-induzierende Signale können verkürzte Telomere nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen sein, irreparable DNA- und Chromatin-Schäden aber auch die Akkumulation von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS). Diese Stressoren führen zur Aktivierung der p53- und pRB-Signalwege und damit zum Anhalten des Zellzyklus. Replikative Seneszenz ist ein irreversibler Prozess. Im Gegensatz zu „ruhenden“ Zellen kann der Zellzyklus nicht durch mitogene Stimuli reaktiviert werden (Campisi, 2005; Prieur, et al., 2008).

Alternativ kann Seneszenz aber auch durch die Überexpression von Onkogenen in transformierenden, prä-malignen Zellen induziert werden. Man spricht in diesem Fall von **Onkogen-induzierter Seneszenz (OIS)**. Dieser Mechanismus gilt als Schutz vor der unkontrollierten Proliferation und vor der Entwicklung von Tumoren aus benignen

Vorstufen. Der Beweis hierfür wurde erstmals 1997 von Serrano und Kollegen erbracht, indem durch die Überexpression von mutiertem H-RAS(G12V) in Zellkulturen Seneszenz induziert werden konnte (Serrano, et al., 1997). Dies wurde auch für weitere aktivierende Mutationen des MAPK-Signalweges untersucht (Lin, et al., 1998; Zhu, et al., 1998). Über die Relevanz von OIS *in vivo* wurde lange spekuliert, bis 2005 durch vier Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, dass die Induktion von Onkogen-induzierter Seneszenz einen Schutz vor der vollständigen malignen Entartung von transformierenden Zellen darstellt. Dies konnte sowohl für die Aktivierung von Onkogenen wie B-RAF(V600E) und RAS(G12V) und des Transkriptionsfaktors E2F3 sowie für den Verlust von Tumorsuppressoren wie PTEN gezeigt werden. Über die Rolle von Seneszenz in der Entstehung und Progression humaner Tumoren ist bis *dato* noch wenig bekannt. Neueste Untersuchungen an benignen Nävi (siehe 2.1.6.3.2) und weiteren humanen Tumorarten weisen jedoch darauf hin, dass OIS in benignen Tumorstufen eine wichtige Rolle spielt (Collado, et al., 2005; Braig, et al., 2005; Chen, et al., 2005; Michaloglou, et al., 2005; Collado, et al., 2010).

2.1.6.3.2 Onkogen-induzierte Seneszenz im Melanom

In humanen Nävi wurde Onkogen-induzierte Seneszenz kürzlich als physiologischer Schutzmechanismus gegen die Tumorentstehung entdeckt. Im Melanom sind zahlreiche Mutationen und molekulare Veränderungen bekannt, von denen einige bereits sehr früh in der Tumorentstehung auftreten (siehe 2.1.6.1). Vor allem mutiertes B-RAF ist bereits in über 80% der benignen Nävi zu finden (Pollock, et al., 2003). Trotzdem befinden sich Nävuszellen jahre- oder jahrzehntelang im proliferativen Arrest. Die konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalweges in Melanozyten führt zwar zur vermehrten Proliferation und daraus resultierend zur Bildung von melanozytären Läsionen (benigne Nävi), allerdings ist die Überexpression eines Onkogens nicht für eine vollständige Transformation ausreichend. Stattdessen weisen benigne Nävi charakteristische Kennzeichen von Seneszenz wie erhöhte p16/INK4A Expression und vermehrte SA- β -Galaktosidase Aktivität auf, während gleichzeitig keine Proliferationsaktivität mehr nachweisbar ist (siehe Abbildung 2-4) (Michaloglou, et al., 2005; Gray-Schopfer, et al., 2007).

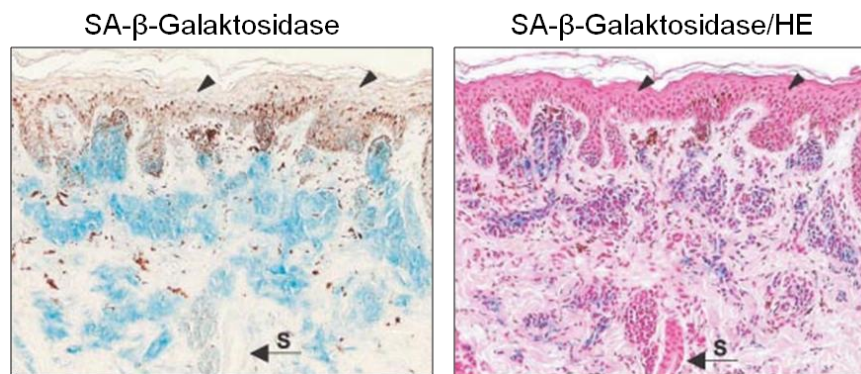


Abbildung 2-4: Nachweis von Seneszenz in humanen melanozytären Nävi. Benigne Nävi weisen eine hohe Aktivität an SA-β-Galaktosidase auf (links). Die gleichzeitige Färbung von Hämatoxylin und Eosin (HE) und SA-β-Galaktosidase (rechts) zeigt, dass ausschließlich Nävuszellen einen seneszenten Phänotyp aufweisen. Das zwischen den Nävusnestern liegende Gewebe, Schweißdrüsen (S) und epidermale Zellen (Pfeile) zeigen keine Aktivität von SA-β-Galaktosidase (Michaloglou, et al., 2005)(modifiziert).

Neben B-RAF(V600E) wurden weitere wichtige Melanom-relevante Onkogene im Zusammenhang mit Seneszenz in benignen Melanomvorstufen beschrieben. In Melanozyten führt die Expression des N-RAS(Q61K) Onkogens über die Aktivierung von p16/INK4A und p21/CIP1 zur Akkumulation von pRB und p53 und damit zu Seneszenz. Notwendig für die N-RAS(Q61K)-vermittelte Seneszenz ist jedoch nur die Aktivierung von pRB über p16/INK4A (Haferkamp, et al., 2009). Im Gegensatz zu benignen Nävuszellen gibt es in malignen Tumoren keine oder nur wenige seneszente Zellen. Es ist bis heute unklar, warum starke Onkogene wie B-RAF(V600E) im Melanom zu unkontrollierter Proliferation führen, in Nävuszellen aber Seneszenz auslösen. Da sich viele Melanome aus einem bestehenden benignen Nävus entwickeln (siehe 2.1.4), wird angenommen dass weitere Mutationen ausschlaggebend sind, um den Mechanismus der Onkogen-induzierten Seneszenz zu umgehen.

Die Tumorsuppressoren p53 und pRB gelten als Schlüsselmoleküle für die Induktion von Seneszenz. Diese werden durch p14/ARF bzw. p16/INK4A aktiviert und inhibieren dadurch den Zellzyklus. Im Melanom sind p14/ARF und p16/INK4A häufig durch Mutationen inaktiviert (siehe 2.1.6.1). Dadurch findet keine Inhibition des Zellzyklus durch p53 bzw. pRB statt und es kommt zur unkontrollierten Proliferation.

Verschiedene Studien am Mausmodell konnten zeigen, dass das Fehlen von p14/ARF und p16/INK4A eine wichtige Rolle in der malignen Transformation spielt. Transgene Mäuse mit mutiertem B-RAF entwickeln bei gleichzeitiger Deletion von *CDKN2A* Melanome aus den benignen Vorstufen, während die Mutation von B-RAF alleine nicht ausreichend ist (Prieur, et al., 2008; Goel, et al., 2009). H-RAS(G12V) oder N-RAS(Q61K) transgene Mäuse entwickeln ebenfalls nur bei gleichzeitiger Deletion von p16/INK4 oder p14/ARF maligne Tumore aus melanozytären Läsionen (Ackermann, et al., 2005; Chin, et al., 1997). Es wurden jedoch auch Mechanismen unabhängig von *CDKN2A*, p53 und pRB beschrieben. Dankort und Kollegen konnten zeigen, dass der Verlust von PTEN für die maligne Transformation von B-RAF(V600E)-positiven Nävuszellen ausreicht (Dankort, et al., 2009). Des Weiteren weisen B-RAF(V600E)-positive humane Nävi trotz Seneszenz ein sehr heterogenes Expressionsmuster von p16/INK4A auf. Dies zeigt, dass p16/INK4A nicht allein notwendig für die B-RAF(V600E)-vermittelte Seneszenz in benignen Nävuszellen ist (Michaloglou, et al., 2005; Scurr, et al., 2011). Studien an humanen Melanozyten zeigten weiterhin, dass N-RAS(Q61K) unabhängig von p14/ARF oder p16/INK4A zur Induktion von Seneszenz führt (Haferkamp, et al., 2009). Diese Daten weisen auf zusätzliche, noch unbekannte Mechanismen der Seneszenz-Induktion hin.

Inzwischen wurden weitere, teils sekretierte Faktoren wie IGFBP7 (*insulin growth factor binding protein 7*), und Interleukin 6 und 8 identifiziert, die vermutlich auf auto- und parakrine Weise in die Seneszenz-Mechanismen involviert sind. Dies konnte jedoch noch nicht eindeutig bestätigt werden. Durch den Verlust eines oder vermutlich mehrerer dieser Faktoren könnten Melanomzellen dem Mechanismus der Seneszenz entgegenwirken (Kuilman, et al., 2008; Wajapeyee, et al., 2008; Scurr, et al., 2010). Onkogen-induzierte Seneszenz gilt demnach als ein wichtiger Tumorsuppressor-Mechanismus in benignen Tumorstufen, dessen Reaktivierung in malignen Tumoren als potentes therapeutisches Ziel diskutiert wird (Collado, et al., 2010). Daher ist die Suche nach weiteren Seneszenz-assoziierten Faktoren Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten.

2.1.7 Mausmodelle in der Melanomforschung

Um die komplexen Zusammenhänge von Mutationen und Fehlregulationen in der Pathogenese von Tumorerkrankungen zu untersuchen und zu verstehen, sind *in vitro* Analysen mit Hilfe von Zellkulturen oder biochemischen Verfahren häufig nicht ausreichend und stoßen an ihre Grenzen. Daher ist es bei vielen Fragestellungen unerlässlich, Zusammenhänge vor dem Hintergrund des gesamten Organismus zu untersuchen und auf Tiermodelle zurückzugreifen. Dies betrifft Untersuchungen zur Rolle von bestimmten Molekülen und Signalwegen in der Entstehung und Progression von Tumoren. Aber auch bei Untersuchungen von komplexen Mechanismen wie dem Einfluss des Immunsystems oder der Rolle des umgebenden Gewebes ist man häufig auf Tiermodelle angewiesen. Die Entwicklung, Erprobung und Verbesserung von Medikamenten und Therapien wäre zudem ohne Tierversuche bis heute nicht möglich, da die Möglichkeiten zur Forschung am Menschen aufgrund ethischer sowie technischer Gründe stark limitiert sind. Trotzdem sollten unnötige Tierversuche vermieden und soweit möglich, durch alternative Verfahren ersetzt werden.

2.1.7.1 Übersicht und Verwendung von Melanom-Mausmodellen

Da das maligne Melanom ein besonders aggressiver Tumor mit früher Neigung zur Metastasierung ist, liegen die Schwerpunkte der Forschung auf der Identifikation der frühen Ereignisse in der Tumorentstehung und -progression. Ziel ist es dabei, die Progression des Tumors und vor allem die Bildung von Metastasen zu verhindern. In den letzten Jahren wurde hierfür eine Vielzahl von Melanom-Mausmodellen generiert, die abhängig von der Fragestellung Verwendung finden. Man unterscheidet zwischen Transplantationsmodellen und Mausmodellen, bei denen genetische Modifikationen zur Melanomentwicklung führen.

Transplantationsmodelle sind vor allem zur Untersuchung von progressiven Tumoren mit Metastasenbildung sowie zur Testung von Therapeutika geeignet. Man unterscheidet zwischen xenogenen und syngenesischen Transplantationsmodellen. Bei der **Xenotransplantation** werden Tumorzellen oder Tumorgewebe in Mäuse transplantiert, die aus anderen Organismen, zum Beispiel dem Menschen, stammen.

Dieses Modell ermöglicht es, den Einfluss verschiedener Modifikationen oder Therapeutika auf das Wachstum und die Metastasierung des Tumormaterials im Organismus zu untersuchen. Damit das Fremdmaterial nicht durch das Immunsystem abgestoßen wird, erfordert diese Methode die Verwendung immundefizienter Mäuse. Diese basieren beispielsweise auf einem Fehlen des Thymus oder einer NK-Zell (*natural killer cells*)-Defizienz, was häufig an Haarlosigkeit erkennbar ist („Nacktmäuse“). Inzwischen gibt es eine Vielzahl an immundefizienten Mausmodellen für unterschiedliche Fragestellungen (Mueller, et al., 1991; Shultz, et al., 2007). Im Gegensatz zur Xenotransplantation werden bei der **syngen**en **Tranplantation** Tumore oder Zellen übertragen, die aus dem gleichen Organismus hervorgehen. Der Vorteil hierbei ist, dass Mäuse mit intaktem Immunsystem verwendet werden können und dieses somit in die Untersuchungen mit einbezogen werden kann. Eine häufige Anwendung ist daher die Erprobung von immuntherapeutischen Strategien. Ein seit langen etabliertes Beispiel für ein syngenes Transplantationssystem ist das B16-Melanommodell im Mausstamm C57BL/6 (Fidler, et al., 1976; Becker, et al., 2010). **Genetisch modifizierte Mausmodelle** eignen sich vor allem für die Untersuchung zur Rolle von bestimmten Faktoren in der Entstehung des Melanoms, aber auch zur Analyse des Metastasierungsverhaltens. Genetisch modifizierte Mausmodelle basieren auf Veränderungen im Genom, die zur spontanen oder, beispielsweise durch Karzinogene induzierbaren Entstehung von Melanomen führen. In Anlehnung an die Erkenntnisse aus dem humanen Melanom werden dabei in der Maus entweder Tumorsuppressoren inaktiviert oder Onkogene und Melanom-induzierende Faktoren aktiviert. Werden Gene ausgeschaltet, spricht man von einem „knock-out“-Mausmodell. Beim Einbringen von Fremdgenen handelt es sich um „transgene“ Mäuse. Transgene Tiere können zum einen durch die zufällige Integration eines Transgen-Konstruktes in das Genom generiert werden. Diese Methode wird in der Melanomforschung häufig verwendet, um eine Melanozyten-spezifische Überexpression eines Onkogens zu erreichen. Hierfür steht das Transgen unter Kontrolle eines Melanozyten-spezifischen Promotors, wie beispielsweise dem Tyrosinase-Promotor. Des Weiteren können endogene Gene spezifisch verändert oder durch andere DNA-Sequenzen ersetzt werden. Diese Methode zur Herstellung

von transgenen Mäusen basiert auf homologer Rekombination. Durch Einbringen von entsprechend genetisch modifizierten embryonalen Stammzellen in einen frühen Maus-Embryo können spezifisch DNA-Sequenzen eines endogenen Genes durch andere Gensequenzen ersetzt („knock-in“) oder ein Gen spezifisch ausgeschaltet („knock-out“) werden. Zusätzlich können mit dieser Methode Mäuse generiert werden, welche spezifisch mutierte Formen eines Genes in einem bestimmten Gewebe exprimieren (Larue, et al., 2007).

Da humane Melanome eine Vielzahl an genetischen molekularen Veränderungen aufweisen (siehe 2.1.6.1 und 2.1.6.2), sind Mausmodelle, die auf einer dieser genetischen Modifikation basieren ein effektives Modell, spiegeln jedoch nur einen Teil der humanen Situation wieder. Aus diesem Grund gibt es in der Melanomforschung inzwischen eine Vielzahl an transgenen Mausmodellen (Becker, et al., 2010; Damsky, et al., 2010). Ein Teil wurde bereits unter Abschnitt 2.1.6.3.2 erwähnt. Da Untersuchungen am Grm1-transgenen Melanom-Mausmodell einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit darstellen, wird dieses im folgenden Abschnitt genauer beschrieben.

2.1.7.2 Das *Grm1*-transgene Melanom-Mausmodell

Das Grm1-transgene Melanom-Mausmodell (Tg(*Grm1*)EPv) basiert auf der Überexpression des metabotropen Glutamatrezeptors 1 (Grm1, mGluR1). Das Mausmodell wurde 2003 von Pollock und Kollegen generiert, nachdem ein zuvor entwickeltes transgenes Adipositasmodell (TG3) mit der spontanen Entwicklung von Melanomen einen unerwarteten Phänotyp zeigte. Diese Tiere entwickelten massive Melanome an den unbehaarten Hautregionen. Je nach Schweregrad traten zudem Metastasen in Lymphknoten und Milz sowie auch in fernen Organen wie Lunge, Leber und Gehirn auf. Durch weitere Analysen stellte sich heraus, dass die Melanomentstehung auf der Insertion des Transgenes in das dritte Intron des *Grm1*-Genes basiert. Dies führte zur vermehrten Grm1-Expression und zur Melanomentstehung (Zhu, et al., 1998; Zhu, et al., 2000).

Um die Überexpression von Grm1 als Ursache der Melanomentstehung im TG3-Modell zu zeigen, wurde ein weiteres Grm1-transgenes Mausmodell (Tg(*Grm1*)EPv)

generiert. Das Transgen steht dabei unter der Kontrolle des Dopachrom-Tautomerase (Dct) Promotors, wodurch die Grm1-Expression spezifisch in melanozytären Zellen erfolgt. Wie im TG3-Modell zeigten sich bei den Grm1-transgenen Tieren zunächst nävusartige Läsionen, die innerhalb von vier bis sechs Monaten in maligne Melanome übergingen (Abbildung 2-5). Die Tumorentstehung trat bei allen transgenen Tieren mit 100% Wahrscheinlichkeit auf. Das Melanomwachstum trat wiederum an unbehaarten Stellen wie dem Schwanz, den Ohren, der Perianalregion sowie teilweise an der Schnauze oder an den Augenlidern auf. In den Lymphknoten sowie in der Milz der transgenen Tiere wurden Melanomzellen nachgewiesen. Im Gegensatz zur TG3-Linie wurden histologisch keine Metastasen in der Lunge und der Leber entdeckt. Der Phänotyp des Grm1-transgenen Mausmodells bestätigte, dass die Überexpression von Grm1 für die maligne Transformation von murinen Melanozyten ausreicht (Pollock, et al., 2003; Marín, et al., 2006; Shin, et al., 2008).

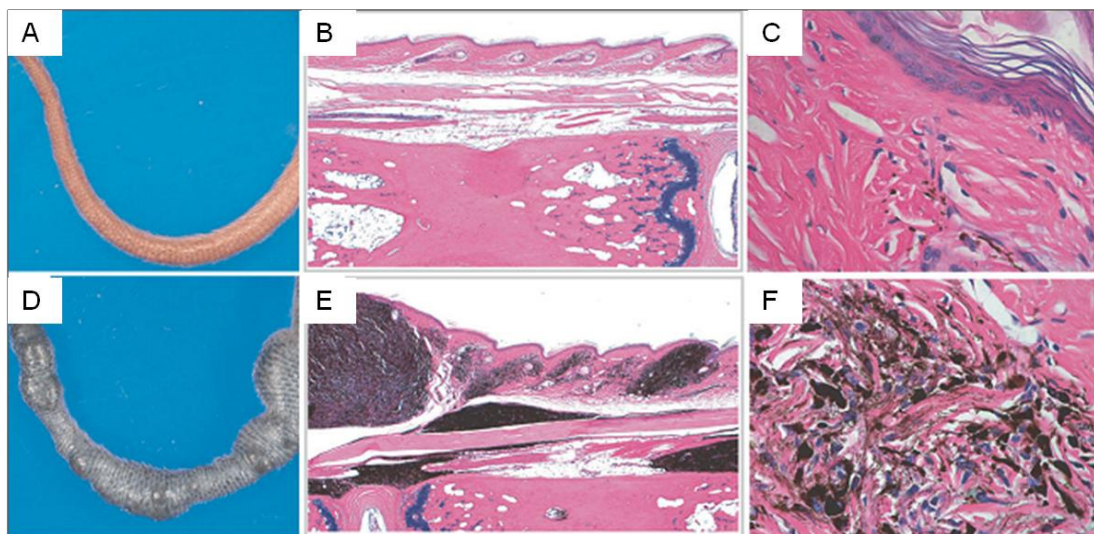


Abbildung 2-5: Melanomwachstum bei Grm1-transgenen Mäusen. Im Vergleich zu normalen C57Bl/6 Mäusen (A-C) weisen Grm1-transgene Mäuse eine Hyperpigmentierung mit massivem Melanomwachstum auf (D). In der histologischen Darstellung sind deutlich die stark pigmentierten Tumore (E) und Tumorzellen (F) erkennbar (Pollock, et al., 2003) (modifiziert).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde zudem die Relevanz von Grm1 im humanen malignen Melanom untersucht. Es zeigte sich, dass bei 40-60% der humanen Melanome und Melanomzelllinien eine Überexpression von Grm1 vorliegt. Des

Weiteren sezernieren diese Melanome erhöhte Mengen des Liganden Glutamat. Der konstitutiv aktive Glutamat-Signalweg führt in diesen Tumoren zu vermehrter Proliferation und damit zur Tumorprogression. Durch Inhibierung des Signalweges konnte die Proliferations- und Migrationsfähigkeit von Melanomzellen deutlich minimiert werden (Namkoong, et al., 2007; Le, et al., 2010).

Das Grm1-transgene Mausmodell ist demnach gut geeignet, um die Funktion und Relevanz von Molekülen und anderen Faktoren im Melanom vor dem Hintergrund des ganzen Organismus zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit diene das Mausmodell als Grundlage, um die Rolle von MIA (siehe 2.2) und BMP6 (siehe 2.3) sowie den Einfluss von Verfettung (siehe 2.4) in der Entstehung und Progression des Melanoms zu erforschen und aufzuklären.

2.2 *Melanoma Inhibitory Activity* (MIA)

In einem Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Proteins *melanoma inhibitory activity* (MIA, MIA1) in der Entstehung des malignen Melanoms näher untersucht. Die bisherigen Erkenntnisse über das Protein und Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe werden im folgenden Abschnitt erläutert.

2.2.1 Die MIA-Proteinfamilie

MIA gehört zur MIA-Proteinfamilie und wurde ursprünglich im Zellkultur-Überstand der humanen Melanomzelllinie HTZ-19d entdeckt (Bogdahn, et al., 1989; Blesch, et al., 1994). Neben MIA zählen drei weitere homologe Mitglieder zur MIA-Familie: MIA2, OTOR (FDP, MIAL) und TANGO. MIA wird von Melanomzellen verstärkt exprimiert und sekretiert, jedoch nicht von normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM). Auch in den meisten benignen Nävi konnte MIA nachgewiesen werden (Bosserhoff, et al., 1996; Bosserhoff, et al., 1999; Perez, et al., 2000). Erhöhte MIA-Proteinmengen wurden auch in einigen anderen malignen Erkrankungen wie dem Chondrosarkom, dem Mammakarzinom und dem Pankreaskarzinom nachgewiesen. Im Normalgewebe wird MIA vor allem im Knorpel exprimiert, wo es zuerst als CD-RAP (*cartilage derived retinoic acid-sensitive protein*)

beschrieben wurde. Aber auch im Mamma-Gewebe wird MIA während der Embryogenese exprimiert (Dietz, et al., 1996; Bosserhoff, et al., 1997a; Bosserhoff, et al., 1999; Xie, et al., 2000; El Fitori, et al., 2005). MIA2 wurde spezifisch in der Leber nachgewiesen, wo es als Tumorsuppressor wirkt. Die Expression von OTOR ist auf das Innenohr beschränkt, während es sich bei TANGO um ein ubiquitäres Protein handelt, das in nahezu allen Zelltypen exprimiert wird (Robertson, et al., 2000; Bosserhoff, et al., 2003; Bosserhoff, et al., 2004; Hellerbrand, et al., 2008).

2.2.2 Genomische Lokalisation und Proteinstruktur

Das *MIA*-Gen enthält 4 Exons und liegt im humanen Genom auf Chromosom 19, das murine MIA-Protein ist auf Chromosom 7 kodiert (Koehler, et al., 1996; Bosserhoff, et al., 1997a). MIA wird zunächst als Vorläufer-Protein mit 131 Aminosäuren (AS) translatiert. Nach Abspaltung eines 24 AS langen Signalpeptides besteht das mature Protein aus 107 AS, was etwa 11 kDa entspricht. Die Signalsequenz vermittelt die Sekretion in den Extrazellularraum. Alle vier Mitglieder der Proteinfamilie besitzen eine SH3 (*Scr-homology 3*) ähnliche Domäne. SH3-Domänen binden mit hoher Affinität an Prolin-reiche Sequenzen. Dieses Strukturmotiv findet sich häufig bei Molekülen, die an Protein-Protein-Interaktionen bei der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt sind und ist daher eher ungewöhnlich für die extrazellulär lokalisierten Mitglieder der MIA-Proteinfamilie (Stoll, et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass MIA mit Molekülen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Laminin und mit bestimmten Integrin-Motiven interagieren kann (Bosserhoff, et al., 2003).

2.2.3 Die Bedeutung von MIA im malignen Melanom

MIA wird im malignen Melanom vermehrt exprimiert, während es in normalen epidermalen Melanozyten und in gesunder Haut nicht nachweisbar ist. Im Serum von Melanompatienten ist die Menge an MIA-Protein deutlich erhöht. Die Höhe des Serumspiegels korreliert dabei mit der Progression der Erkrankung, so dass das Protein als diagnostischer Marker etabliert werden konnte (Bosserhoff, et al., 2001). Anfängliche Experimente wiesen zunächst auf eine inhibierende Funktion des Proteins hin (Blesch, et al., 1994). Es stellte sich jedoch heraus, dass MIA zwar eine

anti-proliferative Wirkung auf Melanomzellen hat, dies jedoch nicht auf eine tumorsuppressive Funktion, sondern auf ein vermindertes Anhaften der Zellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) zurückzuführen ist. MIA wird von Melanomzellen gerichtet in den Interzellularraum sekretiert, wo es mit Fibronektin und Laminin, Komponenten der ECM, interagiert. Des Weiteren werden die Zelloberflächenmoleküle $\alpha 4\beta 1$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin durch die Bindung von MIA inhibiert. Dadurch wird die Interaktion der Zelle über Integrine mit der ECM unterbunden und ein aktives Lösen aus dem Verband ermöglicht (Bosserhoff, et al., 2003; Bauer, et al., 2006; Schmidt, et al., 2010). MIA fördert über diesen Mechanismus die Migration und Invasion von Melanomzellen und damit die Progression der Erkrankung (Bosserhoff, et al., 2001; Guba, et al., 2000). MIA spielt vermutlich auch in der frühen Entwicklung des Melanoms eine Rolle. *In vitro* Studien zeigten, dass das Ausschalten der MIA-Expression in Melanomzellen zu einer veränderten Zellmorphologie und einer Wiederherstellung von Zell-Zell-Kontakten führt. Die Melanin-Synthese wird reaktiviert und Melanom-assoziierte Gene ausgeschaltet. Dadurch zeigte sich, dass MIA die Expression anderer Gene beeinflussen und zu einem de-differenzierten Phänotyp im Melanom beitragen kann (Poser, et al., 2004; Tatzel, et al., 2005; Schiffner, et al., 2011). Die genaue Rolle von MIA in der frühen Melanom-Entstehung ist jedoch weiterhin unklar und wurde in einem Teil der vorliegenden Arbeit untersucht (siehe 4.2).

2.2.4 Das MIA-*knockout* Mausmodell

MIA ist im Melanom vermehrt exprimiert und fördert die Progression der Erkrankung. Im gesunden Gewebe ist MIA ausschließlich im Knorpel zu finden. Um die physiologische Bedeutung des Proteins zu klären, wurde ein MIA-defizientes Mausmodell („MIA-*knockout*“ Maus) entwickelt. Die Tiere sind lebensfähig und nach der Geburt normal entwickelt. Es wurden minimale Strukturveränderungen im Knorpelgewebe, jedoch kein gravierender Phänotyp festgestellt (Moser, et al., 2002). Weiterführende Studien ergaben, dass MIA-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine vermehrte Proliferation, jedoch eine verminderte Differenzierung im Knorpelgewebe aufweisen und MIA somit an der

Knorpelentwicklung beteiligt ist (Schmid, et al., 2010; Tscheudschilsuren, et al., 2006).

2.3 *Bone-morphogenetic protein 6 (BMP6)*

In einem Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle und Relevanz von BMP6 (*bone-morphogenetic protein 6*) in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms untersucht. Im folgenden Abschnitt werden deshalb die aktuellen Erkenntnisse über BMPs und deren Rolle in Tumoren, insbesondere im Melanom erläutert.

2.3.1 Die BMP-Proteinfamilie

Bone-morphogenetic proteins (BMPs) sind sekretierte Wachstumsfaktoren, die zur TGF- β (*transforming growth factor beta*) Superfamilie zählen. Bis dato wurden etwa 20 Mitglieder der BMP-Familie beschrieben. BMPs sind in viele essentielle Prozesse wie die Entwicklung der Organe und des Nervensystems sowie allgemein in Zellwachstum und Differenzierung involviert. Die Moleküle werden nach ihrer Sequenzähnlichkeit in vier Untergruppen unterteilt: BMP2/4, BMP5/6/7/8a/8b, BMP9/10 und BMP12/13/14 (Bragdon, et al., 2011). Alle BMPs werden als 400-500 Aminosäuren große Vorläufermoleküle synthetisiert. Diese bestehen aus einem N-terminalen Signalpeptid, das die Sekretion vermittelt, einer für die korrekte Faltung zuständigen Prodomäne sowie dem C-terminalen eigentlichen Peptid. Nach der Sekretion und Abspaltung vom Propeptid können BMPs entweder an die extrazelluläre Matrix, an lösliche Antagonisten, an Ko-Rezeptoren oder an Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren binden. BMP-Moleküle sind als Homodimere aktiv, es wurden aber auch BMP2/5-, BMP2/6-, BMP2/7- und BMP2/7b-Heterodimere *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Little, et al., 2009; Sieber, et al., 2009). BMP-Rezeptoren sind heterodimere Rezeptorkomplexe bestehend aus einer Typ I- und einer Typ II-Serin/Threonin-Kinase Rezeptor-Untereinheit. Bisher wurden acht verschiedene BMP-Rezeptoren identifiziert, welche wiederum in zwei Gruppen eingeteilt werden. ALK1 (Acvr11), ALK2 (ActR1), ALK3 (BR1a), ALK4 (ActRIb) und ALK6 (BR1b) sind Typ I-Rezeptoren, BRII, ActRIIa und ActRIIb bilden die Gruppe der

TypII-Rezeptoren. Für die BMP-spezifische Signaltransduktion ist immer die Aktivierung eines Heterodimers aus Typ I- und Typ II-Rezeptoren nötig. Die Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulär lokalisierten Bindedomäne und einer intrazellulären Serin/Threonin-Kinase Domäne. Typ I-Rezeptoren werden erst durch Ligandenbindung und Transphosphorylierung durch den Typ II-Rezeptor aktiv während Typ II-Rezeptoren konstitutiv aktiv sind. Durch die Aktivierung eines Rezeptorkomplexes können sowohl Smad-abhängige als auch Smad-unabhängige Signaltransduktions-Wege aktiviert werden und somit verschiedene BMP-Zielgene beeinflusst werden. Welcher Weg aktiviert wird, hängt von verschiedenen Faktoren ab: Zum einen binden BMPs mit unterschiedlicher Affinität an die verschiedenen Untereinheiten der Rezeptorkomplexe. Des Weiteren spielen die Expressionsstärke der Liganden und der Rezeptoren sowie mögliche Co-Rezeptoren und Antagonisten eine Rolle (Bragdon, et al., 2011; Sieber, et al., 2009).

2.3.2 Funktion und Bedeutung von BMPs

BMPs wurden in den 60er Jahren zum ersten Mal aus Knochenextrakten isoliert und als wichtige Faktoren in der Knorpel- und Knochenentwicklung beschrieben (Urist, 1965). BMPs spielen in zahlreichen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Überleben eine bedeutende Rolle. Während der Embryogenese sind sie essentielle Mediatoren in der Gewebeorganisation: Durch einen BMP-Gradienten entsteht in der frühen Embryogenese die dorso-ventrale Achse. Ferner sind BMPs an der Entwicklung verschiedener Organe wie Herz, Nervensystem und Knorpelgewebe beteiligt. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass BMPs die Differenzierung des zentralen Nervensystems, der Neuralleiste und der Epidermis aus ektodermalen Zellen fördert (Hogan, 1996; Dale, et al., 1999; De Robertis, et al., 2004). Embryonal und postnatal spielen BMPs zudem eine wichtige Rolle in der Knochenbildung und Knochenregeneration, indem sie in Osteoblasten und Vorläuferzellen von Chondrozyten Proliferation, Differenzierung und Apoptose steuern (Wozney, et al., 1988; Wang, et al., 1990; Wozney, 1992; Chen, et al., 2004). Über die Rolle von BMPs in der Entstehung und Progression von Tumoren gibt es zum Teil kontroverse Ergebnisse. Einerseits konnten zahlreiche *in vitro* Studien

zeigen, dass vor allem die BMPs 2, 4, 6 und 7 die Entstehung und Progression verschiedener Krebsarten fördern. Erhöhte Expressionswerte dieser BMPs wurde unter anderem in Osteosarkom-, Mammakarzinom-, Prostatakarzinom- und Nierenzellkarzinom-Zelllinien gefunden (Thawani, et al., 2010). Auch im hepatozellulären Karzinom wird BMP4 vermehrt exprimiert und trägt zur Tumorprogression bei (Maegdefrau, et al., 2009). Ferner wurde gezeigt, dass beispielsweise die Migrations- und Invasionsfähigkeit von Mammakarzinom- und Prostatakarzinom-Zelllinien durch BMP2- und BMP4-Behandlung gesteigert wird (Raida, et al., 2005). BMP2 und BMP6 fördern zudem das invasive Potential von Prostatakarzinom-Zellen (Dai, et al., 2005). *In vivo* konnte unter anderem gezeigt werden, dass BMP2 in Lungentumoren, in Osteosarkomen und Chondrosarkomen gehäuft überexprimiert vorliegt und vermutlich an der Tumorentstehung beteiligt ist (Guo, et al., 1999; Langenfeld, et al., 2003).

In anderen Studien wurden die BMPs 2, 4 und 7 eher mit einer tumorsuppressiven Wirkung in Verbindung gebracht. Die BMP7-Behandlung von Mammakarzinom- und Prostatakarzinom-Zellen führte beispielsweise zu einer verminderten Proliferation und Invasivität (Miyazaki, et al., 2004; Buijs, et al., 2007). Die Tumor-suppressive Bedeutung verschiedener BMPs wurde auch in diversen *in vivo* Studien beschrieben: BMP2, BMP4 und BMP7 zeigten in mehreren Tumorarten eher anti-progressive Effekte (Thawani, et al., 2010). Zusammengefasst zeigen diese Studien, dass die Wirkung von BMPs stark vom Zell- und Tumortyp abhängt und diese sowohl tumorfördernde als auch tumorsuppressive Wirkung haben können.

2.3.3 Die Bedeutung von BMPs im malignen Melanom

Während bereits seit Längerem bekannt ist, dass die Expression von TGF β mit der Progression des malignen Melanoms korreliert, wurde die Rolle von BMPs in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms bis heute nur wenig untersucht (Schmid, et al., 1995). Kürzlich veröffentlichte Studien konnten jedoch zeigen, dass BMPs im malignen Melanom eine wichtige Rolle spielen. Im Vergleich zu benignen Nävi und normalen Melanozyten werden BMP2, BMP4 und BMP7 im malignen Melanom verstärkt exprimiert. Für BMP2 und BMP4 konnte gezeigt werden, dass

diese zur vermehrten Migration und zu einer erhöhten Invasivität von Melanomzellen beitragen. Die BMP-Sekretion durch Melanomzellen führt zu einer verstärkten Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Dadurch wird der Abbau von Bestandteilen der extrazellulären Matrix gefördert was wiederum das Lösen von Tumorzellen aus dem Verband ermöglicht (Rothhammer, et al., 2005; Rothhammer, et al., 2008). Durch die Sekretion von BMP2 und BMP4 wird die Ausbildung tubenförmiger Auswüchse („*vascular mimicry*“) auf autokrine Weise begünstigt und damit die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen gewährleistet. Des Weiteren wirken BMP2 und BMP4 chemoattraktiv auf Endothelzellen. Dadurch wird die Bildung neuer Blutgefäße zum Tumor gefördert (Tumor-Angiogenese) (Rothhammer, et al., 2007). Über BMP7 ist bekannt, dass es Wachstums-inhibierend auf melanozytäre Zellen wirkt, des Weiteren scheint BMP7 der Invasivität von Melanomzellen entgegenzuwirken. Während der Tumor-Progression exprimieren Melanomzellen jedoch verstärkt den BMP-Antagonisten Noggin, so dass die Zellen resistent gegen die BMP7-Wirkung werden (Hsu, et al., 2008; Na, et al., 2009). Über eine mögliche Rolle der anderen Mitglieder der BMP-Proteinfamilie im malignen Melanom ist bis *dato* nichts bekannt. Die Rolle von BMP6 in der Melanomentstehung und -progression wurde in einem Teil der vorliegenden Arbeit näher untersucht (siehe 4.3).

2.3.4 Das BMP6-*knockout* Mausmodell

Das BMP6-defiziente Mausmodell (BMP6^{-/-}) wurde 1998 von der Gruppe um Robertson generiert und beschrieben. Die Tiere basieren auf dem Albino-Stamm 129Sv/Ev. Die Modifikation des *Bmp6*-Genes erfolgte durch Einfügen einer MC1-Neo Kasette in das zweite kodierende Exon. Dadurch wird kein funktionelles BMP6-Protein mehr gebildet. BMP6^{-/-} Mäuse sind lebensfähig, fertil und entwickeln sich weitgehend normal. Neben einer verzögerten Verknöcherung des Sternums wurden keine Auffälligkeiten in den Geweben gefunden, die BMP6 bekanntlich exprimieren. Vermutlich wird das Fehlen von BMP6 durch die Ko-Expression von BMP2 kompensiert, so dass keine Störungen in der Knochen- und Organentwicklung auftreten (Solloway, et al., 1998). In Studien mit BMP6-transgenen Mäusen wurde

gezeigt, dass BMP6 ab Tag 15,5 der Embryogenese bis 6,5 Tage *postpartum* verstärkt in der Epidermis exprimiert wird. Zusammen mit BMP7 trägt es zur dermalen Entwicklung bei. BMP6-defiziente Tiere weisen jedoch keine Fehlentwicklung der Haut auf, vermutlich wird das fehlende BMP6 auch hier durch andere BMPs kompensiert (Wall, et al., 1993). Mehrere Studien konnten kürzlich zeigen, dass BMP6 ein maßgeblicher Regulator des Eisenstoffwechsels ist. Dabei zeigte sich, dass adulte BMP6^{-/-} Mäuse einen gravierenden Phänotyp aufweisen, welcher der humanen Stoffwechsel-Erkrankung Hämochromatose ähnelt (Andriopoulos, et al., 2009; Meynard, et al., 2009; Arndt, et al., 2010).

2.4 Verfettung und Tumorgenese

Der Einfluss von exogenen Faktoren, insbesondere von Übergewicht und erhöhtem Körperfettanteil auf die Entstehung maligner Erkrankungen rückt immer mehr in den Fokus der aktuellen Forschung. In einem Teil dieser Arbeit wurde die Relevanz von Verfettung auf die Entstehung und Metastasierung des malignen Melanoms genauer untersucht. In den folgenden Abschnitten werden daher die aktuellen Erkenntnisse über die Rolle von Übergewicht und Verfettung in der Entstehung verschiedener Tumorarten erläutert.

2.4.1 Risikofaktoren für maligne Erkrankungen

Es sind mittlerweile viele Risikofaktoren und Vorbelastungen bekannt, welche die Entstehung von bösartigen Erkrankungen begünstigen oder sogar deren Ursache sein können. Ein Teil der Krebserkrankungen entsteht aufgrund genetischer Prädispositionen. Die epidemiologische Forschung der letzten Jahre und Jahrzehnte hat aber deutlich gezeigt, dass der größere Anteil auf exogene Faktoren zurückzuführen ist. Dabei handelt es sich zum einen um Schadstoffbelastungen aus der Umwelt. Aber auch die Lebens- und Arbeitssituation sowie Ernährungs-, Trink- und Rauchergewohnheiten spielen eine wichtige Rolle. Wie bereits beschrieben, steigt beispielsweise durch häufige im Kindes- und Jugendalter erlittene Sonnenbrände das Risiko, im Laufe des Lebens an Hautkrebs zu erkranken. Starke Raucher haben im Vergleich zu Nichtrauchern ein deutlich erhöhtes Risiko, an

Lungenkrebs, Kehlkopfkrebs oder an anderen bösartigen Tumoren zu erkranken. Durchschnittlich sind 25-30% aller Krebserkrankungen und Todesfälle auf das Rauchen zurückzuführen (Quelle: Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg). Ein zu hohes Körpergewicht begünstigt in hohem Maß vor allem Herz-Kreislaufkrankungen und Diabetes. Wie zahlreiche Studien belegen, ist starkes und extremes Übergewicht und der damit verbundene hohe Körperfett-Anteil aber auch ein bedeutender Risikofaktor für zahlreiche maligne Erkrankungen (Bianchini, et al., 2002).

2.4.2 Übergewicht und Krebsrisiko

Der „body -mass index“ (BMI) gibt Ausschluss über das Verhältnis von Körpergewicht zur Körpergröße und errechnet sich aus dem Körpergewicht [kg], dividiert durch das Quadrat der Körpergröße [m]. Der individuelle Idealwert hängt vom Geschlecht, vom Alter und auch vom Körperbau ab. Durchschnittlich spricht man aber bei einem BMI zwischen 25 und 30 kg/m^2 von Übergewicht, ab 30 bzw. 40 kg/m^2 von Adipositas und extremer Adipositas (Quelle: Robert-Koch-Institut). Der Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht und dem Risiko an Krebs zu erkranken, wurde in diversen Studien erforscht und beschrieben. Demnach korreliert ein erhöhter BMI direkt mit einem höheren Krebsrisiko. Dies gilt für häufige als auch seltenere Tumorarten. Bei Männern ist eine Zunahme des BMI von 5 kg/m^2 mit einem vermehrten Auftreten von Speiseröhrenkrebs, Schilddrüsenkrebs, Kolon- und Nierenzell-Karzinom assoziiert. Bei Frauen steigt bei einer BMI-Zunahme von 5 kg/m^2 vor allem das Risiko, am Endometrium-Karzinom, Gallenblasen- und Nierenzell-Karzinom oder am Speiseröhrenkrebs zu erkranken. Des Weiteren gibt es Tumorarten, deren Auftreten etwas weniger häufig mit einem erhöhten BMI korreliert. Dabei handelt es sich bei Männern um das multiple Myelom, Darmkrebs, Leukämien, das Non-Hodgkin Lymphom sowie um das maligne Melanom. Bei Frauen gibt es eine leichte Korrelation zwischen einem erhöhten BMI und dem Auftreten von Leukämien, Schilddrüsenkrebs, postmenopausalem Brustkrebs, Pankreas- und Kolon-Karzinom sowie dem Non-Hodgkin Lymphom. Deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede in der Korrelation zwischen erhöhtem BMI und

Krebsrisiko wurden beim Nierenzell-Karzinom und verschiedenen Darmkrebsarten festgestellt (Renehan, et al., 2008; Bianchini, et al., 2002). Bei Adipositas besteht des Weiteren ein erhöhtes Risiko, am hepatozellulären Karzinom (HCC) zu erkranken. Eine Folge von Adipositas ist die Verfettung der Organe, insbesondere der Leber. Man spricht dabei von einer nicht-alkoholischen Fettleberhepatitis (NAFLD). Durch die Fetteinlagerungen in die Leber kann sich daraus eine nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) entwickeln, die häufig in eine Leber-Zirrhose mündet. 70-90% der hepatozellulären Karzinome entstehen aus einer zirrhotischen Leber (Caldwell, et al., 2004; Spangenberg, et al., 2009; Starley, et al., 2010). Insgesamt hat der Anteil an deutlich übergewichtigen Menschen in den letzten Jahren weltweit zugenommen (Quelle: *World Health Organization*, WHO). Daher sind beispielsweise in den USA mittlerweile 15-20% der durch Krebs verursachten Todesfälle auf Übergewicht oder extreme Adipositas zurückzuführen (Calle, et al., 2003; Flegal, et al., 2010).

2.4.3 Ursachen für erhöhtes Krebsrisiko bei Übergewicht

Es gibt eine eindeutige Korrelation zwischen Übergewicht und einem erhöhten Krebsrisiko. Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Das Fettgewebe hat einerseits die Aufgabe, Energie in Form von Triglyceriden zu speichern und bei Bedarf abzugeben. Des Weiteren ist es selbst physiologisch hochaktiv indem es durch die Ausschüttung zahlreicher Hormone und Wachstumsfaktoren wie Leptin, Resistin, Adiponektin und TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) den Fettstoffwechsel reguliert. Eine Rolle für das erhöhte Krebsrisiko bei Adipositas spielt vermutlich der Überschuss an verfügbarer Energie aufgrund des erhöhten Körperfettanteiles. Anhand von Tierexperimenten konnte in diversen Studien gezeigt werden, dass eine verminderte Energiezufuhr das Krebsrisiko deutlich herabsetzt (Bianchini, et al., 2002). Zudem ist bei einer Adipositas das Gleichgewicht zwischen Energiespeicherung und Energieabgabe gestört. Es werden vermehrt freie Fettsäuren, Resistin und TNF- α und gleichzeitig weniger Adiponektin abgegeben. Die Folge ist eine vermehrte Produktion des Peptidhormons Insulin durch die Pankreas. Insulin-sensitive Gewebe wie Muskeln und Leber entwickeln

daraus häufig eine Insulin-Resistenz, welche durch eine weiter gesteigerte Insulin-Sekretion ausgeglichen wird. Die Folge ist ein chronisch erhöhter Insulinspiegel, was die Entstehung von verschiedenen Krebsarten wie Kolon-Karzinom, Pankreas-Karzinom, Endometrium- und Mamma-Karzinom fördert (Calle, et al., 2004). Die tumorigene Wirkung von Insulin ist einerseits auf die Expression von Insulin-Rezeptoren in den (prä-) malignen Zellen zurückzuführen. Der erhöhte Insulin-Spiegel beeinflusst aber auch die Expression und Aktivität weiterer Hormone und Wachstumsfaktoren wie beispielsweise IGF1 (*insulin-like growth factor 1*). Der Wachstumsfaktor IGF1 hat, wie Insulin, eine proliferative und anti-apoptotische Wirkung und fördert das Wachstum von Tumorzellen (Frasca, et al., 2008; Gallagher, et al., 2010). Des Weiteren beeinflusst adipöses Gewebe die Synthese und Bioverfügbarkeit von Sexual-Steroidhormonen. Eine hohe Menge an zirkulierenden Sexualhormonen korreliert bei Frauen mit einem erhöhten Risiko, am Mamma-Karzinom oder Endometrium-Karzinom zu erkranken (Dickson, et al., 2000; Flötotto, et al., 2001). Es gibt Hinweise, dass eine vermehrte Androgenproduktion bei Männern die Entstehung des Prostata-Karzinoms fördert. Bisher konnte aber nicht bestätigt werden, dass der erhöhte Androgenspiegel und das gesteigerte Prostata-Krebsrisiko auf Übergewicht zurückzuführen ist (Calle, et al., 2004).

2.4.4 Übergewicht und Metastasierung von Tumoren

Bei krankhaftem Übergewicht besteht ein erhöhtes Risiko für maligne Tumoren. Über den Einfluss von Übergewicht und vermehrter Organverfettung auf das Metastasierungsverhalten von Tumorzellen ist bis heute wenig bekannt. Bei einigen Krebsarten besteht jedoch der Verdacht, dass Adipositas mit einer vermehrten Metastasierung und damit einer schlechteren Prognose korreliert. Bei Brustkrebs ist das Risiko für einen schlechten Verlauf durchschnittlich höher, wenn zum Zeitpunkt der Diagnose und bei Therapiebeginn deutliches Übergewicht oder Adipositas vorliegt (Carmichael, 2006; Deglise, et al., 2010). Für das Pankreas-Karzinom konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass Übergewicht nicht nur das Wachstum, sondern auch die Metastasierung der Tumorzellen fördert (Zyromski, et al., 2009). Auch beim Prostata-Karzinom ist das Risiko für einen aggressiven Krankheitsverlauf bei einer

gleichzeitigen Adipositas erhöht (Amling, 2005; Gong, et al., 2007). Im Gegensatz hierzu wurde beim Schilddrüsenkrebs keine Korrelation zwischen Übergewicht und einem progressiven Krankheitsverlauf festgestellt (Paes, et al., 2010). Über den Einfluss von Adipositas auf die Metastasierung von Melanomzellen ist bis heute wenig bekannt. Kürzlich veröffentlichte Studien am Tiermodell weisen jedoch darauf hin, dass ein hoher Körperfettanteil einen positiven Einfluss auf die Invasionsfähigkeit von Melanomzellen hat (Mori, et al., 2005; Kushiro, et al., 2011; Kushiro, et al., 2011). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch weitgehend unklar. Vermutlich spielen auch hier vom adipösen Gewebe sezernierte Faktoren und deren oben erwähnte physiologischen Auswirkungen eine wichtige Rolle.

2.5 Zielsetzung

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Mutationen, fehlregulierte Moleküle und Signalwege sowie epidemiologische Aspekte untersucht und beschrieben, die in die Pathogenese des malignen Melanoms involviert sind. Häufig ist deren genaue Funktion noch unklar oder die Erkenntnisse aus *in vitro* Untersuchungen reichen noch nicht aus, um deren genaue Funktion und Relevanz einzuordnen und für mögliche Therapien zu nutzen. Dies trifft auch auf die Moleküle MIA (*melanoma inhibitory activity*) und BMP6 (*bone-morphogenetic protein 6*) sowie auf die Frage zu, ob durch einen erhöhten Körperfettanteil das Risiko am malignen Melanom zu erkranken, erhöht wird. Ziel der vorliegenden Arbeit sollte deshalb sein, diese Aspekte mittels *in vivo* Analysen näher zu untersuchen und aufzuklären. Die transgene Melanommaus Tg(*Grm1*)EPv sollte hierfür als Modellorganismus dienen. Die Arbeit lässt sich somit in folgende drei Teile gliedern:

- 1) Das sezernierte Protein MIA wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits intensiv charakterisiert. Dabei wurde es als Melanom-assoziiertes Onkogen identifiziert, das die Metastasierung von Melanomzellen fördert. Aufgrund von Vordaten vermuten wir, dass MIA auch an der frühen Tumorentstehung beteiligt ist. Dieser Aspekt sollte im ersten Teil dieser Arbeit durch Kreuzung der MIA-defizienten Maus mit der *Grm1*-transgenen Mauslinie untersucht werden.
- 2) Für die BMPs 2, 4 und 7 wurde bereits gezeigt, dass sie im Melanom verstärkt exprimiert sind und an der Tumorprogression beteiligt sind. Die Rolle von BMP6 wurde bis heute nicht untersucht. Aufgrund der Daten aus anderen Tumorarten besteht die Annahme, dass auch BMP6 in die Pathogenese des Melanoms involviert ist. Dieser Aspekt sollte im zweiten Teil der Arbeit durch Kreuzung der BMP6-defizienten Mauslinie mit der *Grm1*-transgenen Mauslinie untersucht werden.
- 3) Epidemiologische Untersuchungen weisen darauf hin, dass ein erhöhter Körperfettanteil das Risiko für ein malignes Melanom deutlich erhöht. Im dritten Teil der Arbeit sollte dieser Aspekt *in vivo* anhand eines Verfettungsmodells an der *Grm1*-transgenen Maus untersucht werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Allgemeine Materialien

Bio-Rad, München	Immun-Blot™ PVDF Membran, Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope™
Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf	Biozym LE Agarose
Braun, Frankfurt am Main	Aqua injectable
Carl Zeiss, München	AxioCam, MR Grab Software
Corning Inc., Lowell, MA, USA	T25 und T75 Zellkulturflaschen, 6-well und 96-well Platten
Dako, Hamburg	Envision™ Detection Systems Peroxidase/DAB
Gibco, Grand Island, NY, USA	GlutaMAX™, Dispasepulver
GraphPad Software Inc., San Diego, USA	GraphPad Prism4.00 Software
Invitrogen, Carlsbad, USA	SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit, Ready-Load™ 100 bp und 1 kb DNA Ladder
J.T. Baker, Griesheim	Ethanol, Methanol und alle nicht genannten flüssigen Chemikalien

Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen	Glas-Objektträger
Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz	Amaxa™ NHEM-Neo Nucleofector™ Kit
Merck, Darmstadt	Hemacolor Fixierlösung, Farbreagenz rot/blau
Millipore, Eschborn	Einmal-Sterilfilter
Omega Bio-Tek, Norcross, USA	e.Z.N.A.® MicroElute® Total RNA Kit
PAA Laboratories Inc., Dartmouth, USA	Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), RPMI 1640, RPMI 1640 ohne L-Glutamine, Phosphate Buffered Saline (PBS)
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	Fötales Kälberserum (FKS), Penicillin/Streptomycin, Amphotericin-B
Pierce/Peribo Science, Bonn	BCA Protein Assay Kit
PromoCell, Heidelberg	Melanocyte Growth Medium M2, Melanocyte Growth Medium M2 SupplementMix, Melanozyten
Qiagen, Hilden	QIAamp® DNA Mini Kit, siRNAs
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Taq® DNA Polymerase, RNase A, LightCycler® Kapillaren, dN6 Primer, LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Ethidiumbromid, XTT Reagenz, MIA- ELISA
Roth, Karlsruhe	Roti® Load 4x denaturierend

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	Acrylamid Lösung (40%), BSA, TEMED Trypsin, DMSO, DTT, Tween-20, Bromphenolblau, 3-Isobutyl-1- methylxanthine, Bovine Pituitary extract (BPE), sterile Insulinlösung, Catalase, Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA/ PMA), Oligonukleotide, alle nicht aufgeführten Chemikalien in Pulverform in p.a. Qualität
Takara Bio Inc., Shiga, Japan	SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	CryoTubes™, Superfrost® Plus Objektträger
VWR, Darmstadt	Kaiser's Glycerin Gelatine, 96-well Platten für BCA Assay
Whatman International Ltd., Maidstone, England	Whatman 3MM Filterpapier
Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA	BCIP/NBT Substrate Kit

3.1.2 Geräte

Autoklaven:

Tuttnauer/Systec, Wetztenberg	Tischautoklav Modell 2540 EL, Autoklav 2540 EK
-------------------------------	---

Blotapparaturen:

Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell
------------------------------------	---------------------------------------

Brutschränke:

Heraeus, Hanau

Zellinkubator CO₂-Auto Zero,
Begasungsbrutschrank BB6220, CO₂-
Inkubator HeraCell 240

Gelelektrophorese-Apparaturen:

Bio-Rad, München

Wide Mini Sub® Cell GT

Heiz- und Kühlblöcke:

Eppendorf, Hamburg

Thermomixer 5436, Thermomixer
comfort, Thermomixer compact

Mikroskope:

Leica Microsystems CMS GmbH,
Bensheim

DM IL Type 090-135.001

Carl Zeiss, Jena

Axiovert 10, Axiovert 200

Spannungsgeräte:

Bio-Rad, München

PowerPac Basic, PowerPac HC

GE Healthcare Life Science, Freiburg

Electrophoresis Power Supply 1001,
Electrophoresis Power Supply 301

Sterilwerkbänke:

Heraeus, Hanau

LaminAir HB 2448, HeraSafe KS18

Thermocycler:

MJ Research, Waltham, USA

Peltier Thermal Cycler PTC-200

Roche Diagnostics, Mannheim

LightCycler® II, LightCycler® 480

Waagen:

Sartorius, Göttingen	R160P, L2200S
----------------------	---------------

Zentrifugen:

Eppendorf, Hamburg	MiniSpin Plus, Centrifuge 5810R
Heraeus, Hanau	Biofuge 13, Biofuge 22R, Megafuge 1.0
Kisker, Steinfurt	Tischzentrifuge
Roche Diagnostics, Mannheim	LC Carousel Centrifuge

Sonstige Geräte:

Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz	Nucleofector™ I Device
Bachhofer, Reutlingen	UV-Transilluminator IL 350 K, 254nm
Bühler, Edmund, Tübingen	Schüttler SM25
Heidolph, Kehlheim	Magnetrührer MR 2000, MR 2002, Vortexer REAX 2000
IKA-Labortechnik, Staufen	Schüttler IKA-Vibrax VXR
MWG Biotech, Ebersberg	ELISA-Reader Emax, Geldokumentationssystem 2001i
Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen	Nanodrop® ND-1000-UV/Vis Spektralphotometer
Savant, New York, USA	Speedvac Concentrator SC 110
WTW, Weilheim	pH-Meter pH522

3.1.3 Primäre Zellen und Tumorzelllinien

B16-F10	Murine Melanomzelllinie
HMB2	Humane Melanomzelllinie, Ursprung: Metastase
HMB2-MIA5	Stabile antisense-MIA Zellklone, generiert aus HMB2-Zellen
HTZ-19d	Humane Melanomzelllinie, Ursprung: Metastase
Mel Ei	Humane Melanomzelllinie, Ursprung: Primärtumor
Mel Ho	Humane Melanomzelllinie, Ursprung: Primärtumor, DSMZ-Nr.: ACC62
Mel Im	Humane Melanomzelllinie, Ursprung: Metastase
Mel Ju	Humane Melanomzelllinie, Ursprung: Metastase
Mel Juso	Humane Melanomzelllinie, Ursprung: Primärtumor, DSMZ-Nr.: ACC74
Mel Wei	Humane Melanomzelllinie, Ursprung: Primärtumor
Melanozyten	Normale humane epidermale Melanozyten (NHEM)
NIH/3T3	Immortalisierte murine Fibroblastenzelllinie, ATCC-Nr.: CRL-1658
SK-MEL-3	Humane Melanomzelllinie, Ursprung: Metastase, ATCC-Nr.: HTB-69
SK-MEL-28	Humane Melanomzelllinie, Ursprung: Metastase, ATCC-Nr.: HTB-72

3.1.4 Gewebeproben

3.1.4.1 *Humane Gewebeproben*

Tiefgefrorenes humanes Melanomgewebe (PT 1-6 und Met 1-5) sowie Formalin-fixiertes Paraffinmaterial von humanen Melanomen, Nävusproben und Normalhaut wurden von der Gewebebank des Institutes für Pathologie des Klinikums Regensburg bezogen. Die Verwendung des Patientenmaterials erfolgte unter Einhaltung der Richtlinien der Ethikkommission des Klinikums der Universität Regensburg.

3.1.4.2 *Murine Gewebeproben*

Alle murinen Gewebeproben wurden eigenhändig aus den im Labor gezüchteten Mauslinien (3.1.5) isoliert. Paraffinmaterial von Lebern aus C57Bl/6 Mäusen unter Paigenfütterung wurde von Herrn Dr. Christoph Dorn (Innere Medizin I, Uniklinikum Regensburg) zur Verfügung gestellt.

3.1.5 Säugetiere

3.1.5.1 *Transgene Mäuse*

3.1.5.1.1 *Tg(*Grm1*)EPv Maus*

Die Tg(*Grm1*)EPv-transgene Maus wurde durch Einbringen eines Transgenes in das Genom generiert. Das Transgen besteht aus der Sequenz des *Grm1*-Genes (mGluR1, metabotroper Glutamat-Rezeptor 1), das hinter einen aktiven Teil des Dopachromtautomerase (*Dct*)-Promotors kloniert wurde (Pollock, et al., 2003). Die *Grm1*-transgenen Mäuse wurden von Prof. Suzie Chen (Department of Chemical Biology, Rutgers University, Piscataway, USA) und Prof. Jürgen Becker (Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie, Graz) zur Verfügung gestellt.

3.1.5.2 Knockout Mäuse

3.1.5.2.1 MIA-knockout Maus

Die MIA-defiziente Mauslinie wurde durch Einbringen eines PGK/Neomycin-Konstruktes in das Mia-Gen generiert. Durch die Insertion wurden Teile von Exon 2 sowie Exon 3 und 4 komplett deletiert, wodurch kein aktives MIA-Protein exprimiert werden kann (Moser, et al., 2002).

3.1.5.2.2 BMP6-knockout Maus

Die BMP6-defiziente Mauslinie wurde auf 129Sv/Ev-Hintergrund erzeugt und von der Arbeitsgruppe um J. Robertson (Institut für Molekular- und Zellbiologie, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, USA) bezogen (Solloway, et al., 1998).

3.1.6 Antikörper und rekombinante Proteine

3.1.6.1 Rekombinante Proteine

Die Abkürzung „r“ steht für rekombinant, „h“ steht für „human“.

Rekombinantes Protein	Stocklösung	Verdünnung	Hersteller
rhBMP6	100 µg/mL	10-100 ng/mL	R&D Systems, Minneapolis, USA
bFGF/FGF-2	100 µg/mL	2,5 ng/mL	R&D Systems, Minneapolis, USA

3.1.6.2 Primäre Antikörper

Antikörper (generiert in/ Spezies)	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
BMP6 (goat)	Immunhistochemie	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
ERK (p44/42 MAPK) (rabbit)	Western Blot	1:1000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-ERK1/2 (P-p44/42 MAPK) (rabbit)	Western Blot	1:1000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
Grm1 (mGluR1) (rabbit)	Immunhistochemie	1:300	Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA
TRP2 (DCT) (rabbit)	Immunhistochemie	1:500	Abcam, Cambridge, UK

3.1.6.3 Sekundäre Antikörper

Die Abkürzung „AP“ steht für Alkalische Phosphatase, „HRP“ für Horseradish Peroxidase.

Antikörper	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
anti-goat (HRP)	Immunhistochemie	1:50	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
anti-rabbit (AP)	Western Blot	1:4000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
anti-rabbit (HRP)	Immunhistochemie	1:50	Histofine Simple Stain MAX PO (R), Nichirei Biosciences Inc., Tokyo
anti-rabbit (HRP-Polymer Kit)	Immunhistochemie	ready-to-use solution	ZYTOMED Systems GmbH, Berlin

3.1.7 Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München) in lyophilisierter Form bezogen. Nach Lösen in ddH₂O wurden diese als 100 µM Stammlösungen bei -20°C gelagert. In RT-PCR und qRT-PCR Analysen wurden die entsprechenden Primer-Paare in einer Konzentration von 20 µM eingesetzt. Murine Primer wurden mit „m“, humane Primer mit „h“ gekennzeichnet. Alle siRNAs (*small interfering RNAs*) wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen und nach Lösen in RNase-freiem ddH₂O als 10 µM Stammlösungen bei -20°C gelagert.

3.1.7.1 Genomische Primer für Genotypisierungen

Primernamen	Nukleotidsequenz (forward/reverse)	Annealing-temperatur (°C)
mBmp6/Exon2	5'-TCCCCACATCAACGACACCA-3'/ 5'-TCCCCACCACACAGTCCTTG-3'	59
mBmp6/MC1Neo	5'-CGCTGACAGCCGGAACACGG-3'	59
mMia/WT	5'-GCCACTTTTGATGGTTTGCTG-3'/ 5'-ATCCTATCTCCATGGCTGTGG-3'	58
mMia/ko	5'-CCCATCAGCCTCACCGTAGGT-3'/ 5'-CTGCTCTTTACTGAAGGCTCT-3'	58
mMia2/Exon2	5'-AGAGATTACACAGGACCCGAC-3'/ 5'-CCTGCCCACAAATCTTCTCTG-3'	60
mGrm1(EPv)	5'-TCAGGAGTGGAAGACAAGGAG-3'/ 5'-CTTCACCTCAACACATCC-3'	60

3.1.7.2 Primer für Expressionsanalysen

Primername	Nukleotidsequenz (forward/reverse)	Annealing-temperatur (°C)
hβ-Actin	5'-CTACGTCGCCCTGGACTTCGAGC-3'/ 5'-GATGGAGCCGCCGATCCACACGG-3'	58-68
mβ-Actin	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'/ 5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	58-68
hBMP6	5'-AAGGCTGGCTGGAATTTGACATCACG-3'/ 5'-GGTAGAGCGATTACGACTCTGTTGTC-3'	60
mBMP6	5'-TCCCCACATCAACGACACCA-3'/ 5'-TCCCCACCACACAGTCCTTG-3'	60
hE-Cadherin	5'-ATCCTCCGATCTTCAATCCCACCAC-3'/ 5'-GTACCACATTCGTCACTGCTACGTG-3'	60
mGrm1 (mGluR1)	5'-GGGCAGGGAACGCCAATTCT-3'/ 5'-TGGAAGGGCTGCTGGGAGGG-3'	62
hMIA	5'-CATGCATGCGGTCCTATGCCCAAGCTG-3'/ 5'-GATAAGCTTTCACTGGCAGTAGAAATC-3'	60
mMIA	5'-CCAAGCTGGCTGACTGGAAG-3'/ 5'-GCCAGGTCTCCATAGTAACC-3'	60
hp14/Arf	5'-ATGGTGCGCAGGTTCTTGG-3'/ 5'-CCCATCATCATGACCTGG-3'	60
hp15/INK4B	5'-GGAAAAGCCCGGAGCTAACGACC-3'/ 5'-GCACCTTCTCCACTAGTCCC-3'	60
hp16/INK4A	5'-GGAGCAGCATGGAGCCTTCGGC-3'/ 5'-CCACCAGCGTGTCCAGGAAGC-3'	60
hp21/CIP1	5'-CGAGGCACCGAGGCACTCAGAGG-3'/ 5'-CCTGCCTCCTCCCAACTCATCCC-3'	60

hp27/KIP1	5'-CTTGCCCGAGTTCTACTACAG-3'/ 5'-TCAGTCTTTGGGTCCACCA-3'	60
hSLUG	5'-CGGACCCACACATTACCTTG-3'/ 5'-CTACACAGCAGCCAGATTCC-3'	60
hSNAIL1	5'-AGGCCCTGGCTGCTACAAG-3'/ 5'-ACATCTGAGTGGGTCTGGAG-3'	60
hTRP2	5'-TGGAGTGGTCCCTACATCCTA-3'/ 5'-TCACTGGTGGTTTCTTCCG-3'	60

3.1.7.3 siRNAs (small interfering RNAs)

Bezeichnung	Zielsequenz
si-Kontrolle (unspezifische siRNAs)	nicht verfügbar
siMIA #7	GACAGACAAATGGGATTTCTA

3.1.8 Medien, Puffer, Lösungen und Antibiotika

3.1.8.1 Medien zur Anzucht von Säugerzellen

Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	DMEM (PAA, Dartmouth, USA), Zusätze: 10% FKS, 0,1% Penicillin/Streptomycin
Medium für humane Melanozyten	MGM2 (Melanocyte Growth Medium M2, PromoCell, Heidelberg), Zusätze: 0,1% Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium für humane Zelllinien (50 mL)	25 mL DMEM; Zusätze: 10% FKS, 15 mL FKS, 5 mL DMSO

Kulturmedium I für primäre Mausmelanozyten (Vorkultur)	RPMI 1640 ohne L-Glutamin (PAA, Dartmouth, USA), Zusätze: 5% FKS, 0,1% Penicillin/Streptomycin, Amphotericin-B (1:500), Glutamax (200 mM), BPE (10 µg/mL), Catalase (100 U/mL), Insulin (10 µg/mL), bFGF (2,5 ng/mL)
Kulturmedium II für primäre Mausmelanozyten	RPMI 1640 ohne L-Glutamin (PAA, Dartmouth, USA), Zusätze: 5% FKS, 0,1% Penicillin/Streptomycin, Amphotericin-B (1:500), Glutamax (200 mM), BPE (10 µg/mL), Catalase (100 U/mL), Insulin (10 µg/mL), TPA (35 ng/mL), 3-Isobutyl-1-methylxanthine (23 ng/mL)
Stopp-Medium	RPMI 1640 (PAA, Dartmouth, USA), Zusätze: 10% FKS, 0,1% Penicillin/Streptomycin, Amphotericin B (1:500)
Einfriermedium für primäre Mausmelanozyten	95% FKS (v/v), 5% DMSO (v/v)

3.1.8.2 Antibiotika und Antimykotika

Amphotericin-B Stammlösung	250 µg/mL, steril, Lagerung bei -20°C
Penicillin/Streptomycin Stammlösung	steril, Lagerung bei -20°C

3.1.8.3 Puffer und Lösungen

3.1.8.3.1 Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese

TAE (50x)	2 M Tris/Acetat (pH 8,0), 50 mM EDTA
Agarosegel	1-3% (w/v) Agarose, gelöst in 1x TAE
DNA-Ladepuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau; 40% (v/v) Saccharose; 0,25% (w/v) Xylencyanol
Ethidiumbromidlösung	0,04% (w/v) Ethidiumbromid in ddH ₂ O

3.1.8.3.2 Lösungen zur Herstellung von Gesamtprotein-Extrakten (RIPA)

RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1% (w/v) Nonidet® P40; 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat; 0,1% (w/v) SDS; Proteaseinhibitoren (Roche Diagnostics, Mannheim)
-------------	--

3.1.8.3.3 Lösungen für SDS-Gelelektrophorese

Laufpuffer für SDS-PAGE	25 mM Tris/HCl (pH8,5), 200 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
Sammelgel (4%)	375 µL Acrylamid (40% Stammlösung), 450 µL Tris/HCl (1 M, pH 6,8), 2,85 mL H ₂ O, 37,5 µL SDS (40% Stammlösung), 25 µL APS, 3,5 µL TEMED
Trenngel (12,5%)	3,75 mL Tris/HCl (1 M, pH 8,8), 2,97 mL H ₂ O, 100 µL SDS (40% Stammlösung), 50 µL APS, 10 µL TEMED

3.1.8.3.4 Lösungen für Western Blot Analyse

Transferpuffer	10% (v/v) Methanol, 25 mM Tris, 190 mM Glycin
TBS	50 mM Tris/HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl
TBS-T	TBS, 0,1% (v/v) Tween20
Blockingpuffer	5% (w/v) BSA in TBS-T

3.1.8.3.5 Lösung für den Nachweis von Seneszenz-assoziiierter β -Galaktosidase

Fixierlösung	3,7% Formaldehydlösung in PBS
Färbelösung	1 mg/mL X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) in DMSO; 5 mM $K_3Fe(CN)_6$; 5 mM $K_4Fe(CN)_6$; 40 mM Zitronensäure/Phosphatpuffer pH 6,0; 150 mM NaCl; 2 mM $MgCl_2$

3.1.8.3.6 Sonstige Lösungen und Puffer

PBS (steril)	PAA, Dartmouth, USA
RNAse A-Lösung	10 mM Tris/HCl (pH 7,0); 10 mg/mL RNAse A

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus Säugerzellen und murinem Gewebe

Die Isolierung von genomischer DNA aus Zellen oder murinen Gewebestücken wurde unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits (Firma Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution der genomische DNA erfolgte je nach Menge des Ausgangsmaterials in 100-200 µL AE-Puffer.

3.2.1.2 Isolierung von RNA aus Säugerzellen und Mausgewebe

Die Isolierung von RNA erfolgte unter Verwendung des E.Z.N.A. Total RNA Kit I (Firma Omega Bio-Tek, VWR, Darmstadt). Zur Isolierung von RNA aus konfluent wachsenden Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% bzw. 0,02% (w/v)) von der Zellkulturschale gelöst und anschließend pelletiert. Zur Isolierung von RNA aus murinen Gewebestücken wurden diese unter Verwendung eines Precellys Homogenisators und einem Precellys Keramik-Kit (Firma PeqLab Biotechnologies, GmbH, Erlangen) mechanisch zu einer Zellsuspension verarbeitet. Die Isolierung der RNA erfolgte anschließend jeweils nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in 40 µL RNase freiem ddH₂O eluiert und bei -20° gelagert. Vor der reversen Transkription (3.2.1.3) wurde die Konzentration von allen RNA-Proben im Nanodrop® Spektralphotometer (Firma Peqlab, Erlangen) vermessen.

3.2.1.3 Reverse Transkription von RNA (RT)

Pro 20 µL Reaktionsansatz wurden 500 ng RNA, 4 µL First Strand Puffer (5x), 2 µL DTT (0,1 M), 1 µL dNTPs (10 mM) und 1 µL dN₆-Primer (Random Hexamer Primer, 2 mg/mL) eingesetzt und mit ddH₂O auf 19 µL Gesamtvolumen ergänzt. Zur Denaturierung der RNA-Moleküle wurde die Reaktionslösung für 5 min bei 70°C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µL Superscript II Reverse Transkriptase erfolgte

eine einstündige Inkubation bei 37°C. Das Enzym wurde anschließend durch eine 10-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Durch Zugabe von je 1 µL RNase A-Lösung und 20-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die enthaltenen RNA-Moleküle verdaut. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in 50 µL Ansätzen durchgeführt. Pro Ansatz wurden 5 µL PCR-Puffer (10x), 0,5 µL dNTPs (je Nukleotid 10 mM), 1 µL forward Primer (20 µM), 1 µL reverse Primer (20 µM), 5 µL genomische DNA-Lösung (3.2.1.1) und 0,5 µL Taq-DNA-Polymerase (5 U/µL) eingesetzt. Mit ddH₂O wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 µL aufgefüllt. Die PCR-Reaktion wurde im Thermocycler unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

- | | |
|----------------------------|----------------------------------|
| 1. Initiale Denaturierung: | 94°C, 60 sec |
| 2. Denaturierung: | 95°C, 30 sec |
| 3. Primer-Annealing | Annealing-Temperatur x°C, 30 sec |
| 4. Elongation | 72°C, 30-60 sec |
| 5. Finale Elongation | 72°C, 5 min |

Die Annealing-Temperatur wurde unter Berücksichtigung der Schmelzpunkte der verwendeten Primerpaare variiert und angepasst (3.1.7.1). Eine PCR-Reaktion wurde mit 30-35 Amplifikationszyklen durchgeführt. Die Proben wurden anschließend bei 4°C gelagert und mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.1.6) ausgewertet.

3.2.1.5 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Um die Expressionsstärke spezifischer mRNAs zu quantifizieren, wurde eine quantitative RT-PCR unter Verwendung des LightCycler® II Systems und des LightCycler® 480 Systems (beides Firma Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht eine Quantifizierung der amplifizierten cDNA-Menge mit Hilfe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR®

Green). Dabei nimmt das gemessene Signal proportional mit der Menge an PCR-Produkten zu. Nach reverser Transkription (3.2.1.3) der Gesamt-RNA wurden 10 ng cDNA pro 20 µL Ansatz in die qRT-PCR eingesetzt. Zum Reaktionsansatz wurden außerdem 0,5 µL forward Primer (20 µM), 0,5 µL reverse Primer (20 µM), 8,0 µL ddH₂O und 10 µL TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ (für das LightCycler® II System) bzw. 10 µL LightCycler® 480 SYBR Green I Master (für das LightCycler® 480 System) gegeben. Die Annealing-Temperatur wurde unter Berücksichtigung der Schmelzpunkte der verwendeten Primerpaare variiert und angepasst (3.1.7.2). Die Schmelzpunkt-Analyse erfolgte unter Berücksichtigung der Schmelztemperaturen des jeweiligen PCR-Produktes. Die Amplifikation wurde in 35-45 Zyklen durchgeführt. Zur Quantifizierung diente die mRNA-Expression von β -Aktin als Referenz. Die Analyse erfolgte mit der zugehörigen Software nach Angaben des Herstellers.

Im LightCycler® II System wurde die qRT-PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- | | |
|----------------------------|---------------------------------|
| 1. Initiale Denaturierung: | 20°C/sec, auf 95°C, 30 sec |
| 2. Denaturierung: | 20°C/sec auf 95°C, 3 sec |
| 3. Primer-Annealing | 20°C/sec auf x°C, 10 sec |
| 4. Amplifikation | 20°C/sec auf 72°C, 8 sec |
| 5. Messung | 20°C/sec auf Messtemperatur x°C |

Im LightCycler® 480 System wurde die qRT-PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| 1. Initiale Denaturierung: | 4,4°C/sec auf 95°C, 10 min |
| 2. Denaturierung: | 4,4°C/sec auf 95°C, 10 sec |
| 3. Primer-Annealing | 2,2°C/sec auf x°C, 10 sec |

- | | |
|------------------|---|
| 4. Amplifikation | 4,4°C/sec auf 72°C, 20 sec |
| 5. Messung | 4,4°C/sec auf Messtemperatur x°C, 1 sec |

3.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese mit DNA

Die Auftrennung von DNA nach ihrer Größe erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Länge der zu analysierenden DNA-Fragmente wurden 1,5% bis 3%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Dafür wurden je nach Bedarf 1,5 g bis 3 g Agarose in 100 mL 1 x TAE-Puffer durch kurzes Aufkochen gelöst und das Gel in den Gelschlitten gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurden die DNA-Proben im Verhältnis 1:10 mit Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte unter konstanter Spannung von 10 Volt pro Zentimeter Gellänge. Zur Analyse wurde das Gel für 10-30 min in einer 0,04% (w/v) Ethidiumbromid-Lösung inkubiert und die DNA-Banden durch Anregung mit UV-Licht (245 nm) visualisiert.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten (RIPA-Lysat)

Für die Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus kultivierten Zellen wurden diese mit 1x PBS gewaschen, mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale abgekratzt und in 1 mL PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 3000 rpm für 5 min wurde das Zellpellet in 100-200 µL RIPA-Puffer (3.1.8.3.2) resuspendiert und für 15 min bei 4°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die löslichen Proteine von den unlöslichen Zellbestandteilen sowie von DNA und RNA durch erneute Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min (4°C) abgetrennt. Die Proteinlysate wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert. Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes erfolgte mittels BCA-Assay (3.2.2.2).

3.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in RIPA-Lysaten erfolgte unter Verwendung des BCA Protein Assay Kits der Firma Thermo Scientific (Bonn) nach den Angaben des Herstellers. Das Kit beruht auf der sogenannten Biuret-Reaktion, bei der zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) zu einwertigen Kupferionen (Cu^+) reduziert werden (Smith, et al., 1985). Cu^+ bildet mit Bicinchonsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, welcher bei 562 nm quantifiziert werden kann. Die Messung der Adsorption erfolgte in einem ELISA-Reader. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Abgleich mit einer mitgeführten BSA-Standardreihe.

3.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Durch SDS (Natriumdodecylsulfat) werden Sekundär- und Tertiärstrukturen in Proteinen zerstört und Ladungsunterschiede neutralisiert. Dadurch ist es möglich, Proteine unabhängig von der Ladung ausschließlich nach ihrer Größe aufzutrennen. Für die Durchführung der Elektrophorese wurden Proteinlysate (3.2.2.1) von je 40 µg Gesamtproteingehalt (3.2.2.2) mit 1x Roti-Load Auftragspuffer (denaturierend, Roth, Karlsruhe) versetzt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 12,5%iges Polyacrylamidgel (3.1.8.3.3) aufgetragen und bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² Gelfläche aufgetrennt. Zum Abgleich des Molekulargewichtes wurde ein kommerzieller Proteinstandard mit aufgetragen.

3.2.2.4 Western Blot

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen in RIPA-Lysaten (3.2.2.1) wurden diese nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE (3.2.2.3) auf eine PVDF-Membran transferiert und mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Hierfür wurde das Polyacrylamidgel für 15 min in Transferpuffer (3.1.8.3.4) äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde für je 5 min in Methanol und anschließend in Transferpuffer inkubiert. Der elektrophoretische Transfer erfolgte anschließend für 35-45 min bei

konstanten 15 V Spannung (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad). Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit Blockingpuffer (3.1.8.3.4) inkubiert. Die Inkubation mit dem spezifischen primären Antikörper (3.1.6.2) erfolgte in der geeigneten Verdünnung in Blockingpuffer über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T (3.1.8.3.4) für je 5 min wurde die Membran mit einem AP-konjugierten, gegen die konstante Domäne des primären Antikörpers gerichteten sekundären Antikörper (3.1.6.3) in einer geeigneten Verdünnung für 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Nach drei zehnmütigen Waschschritten mit TBS-T erfolgte die Detektion von spezifischen Banden unter Verwendung des Substrates für die Alkalische Phosphatase (BCIP/NBT Substrate Kit, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA).

3.2.2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.2.2.5.1 MIA-ELISA

Zur Bestimmung der Menge von sezerniertem MIA-Protein in Zellkultur-Überständen wurde der MIA-ELISA (Firma Roche Diagnostics, Mannheim) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben verwendet. Die Zellkultur-Überstände wurde im ELISA in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Die Auswertung des ELISAs erfolgte mit Hilfe einer im Testsystem integrierten Standardkurve aus rekombinantem MIA-Protein in der Konzentration von 0 bis 50 ng/mL.

3.2.2.5.2 BMP6-ELISA

Zur Bestimmung der BMP6-Proteinkonzentration in RIPA-Lysaten wurde der BMP6 DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Hierfür wurde ein RIPA-Lysat (3.2.2.1) aus 3×10^6 Zellen hergestellt und die Konzentration des Gesamtproteingehaltes bestimmt (3.2.2.2). Nach Durchführung des BMP6-ELISAs erfolgte die Berechnung des BMP6-Proteingehaltes bezogen auf die gesamte Proteinmenge.

3.2.2.6 Immunhistologie

3.2.2.6.1 Hämalaun/Eosin-Färbung (HE)

Paraffinschnitte von humanem oder murinem Gewebe wurden nach 30-minütiger Inkubation bei 72°C im Wärmeschrank und nachfolgender Behandlung mit Xylol entparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Es folgte eine drei- bis fünfminütige Färbung mit Hemalaun-Lösung und anschließendes Spülen mit Leitungswasser. Nach der Färbung mit einer 1%igen wässrigen Eosin-Lösung für 30-60 sec wurden die Gewebeschnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und unter Verwendung von Kaisers Glycingelatine mit einem Deckgläschen versehen.

3.2.2.6.2 Immunhistochemischer Nachweis der Grm1-, BMP6- und TRP2-Expression an Gewebeschnitten

Die immunhistochemischen Färbungen von Gewebeschnitten wurden von Rudolf Jung und Martina Waeber (Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) etabliert und durchgeführt. Für die spezifische Färbung mit einem BMP6- und einem Grm1-Antikörper wurden Paraffinschnitte nach 30-minütiger Inkubation bei 72°C im Wärmeschrank und nachfolgender Behandlung mit Xylol entparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte in Tris/EDTA Puffer (pH 9.0) im Schnellkochtopf bei 120°C für 5 min erhitzt. Nach dem Blockieren der endogenen Peroxidase mit H₂O₂ und einem Waschschrift erfolgte die Inkubation für 30 min mit dem primären Antikörper in der entsprechenden Verdünnung (3.1.6.2). Die Inkubation mit dem jeweils entsprechenden HRP-gekoppelten sekundären Antikörper (anti-BMP6: anti-goat (HRP); anti-Grm1: anti-rabbit (HRP)/Histofine Simple Stain MAX PO (R); 3.1.6.3) erfolgte anschließend für 30 min bei Raumtemperatur. Die Detektion der Antikörperbindung erfolgte mittels DAB(+)-Lösung (Dako North America, Inc, Carpinteria, CA, USA) nach Inkubation für 10 min. Für den immunhistochemischen Nachweis der TRP2-Expression in Mausgewebe wurde der HRP ZytoChem Polymerkit AEC der Firma Abcam (Cambridge, UK) verwendet (3.1.6.3). Hierfür wurden die Schnitte analog der Grm1- bzw. BMP6-Färbung entparaffiniert und dehydriert und im Tris/EDTA-Puffer (pH 8,5)

erhitzt. Nach dem Spülen mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in der angegebenen Verdünnung (3.1.6.2). Die weitere Behandlung erfolgte den Herstellerangaben entsprechend. Bei allen immunhistochemischen Färbungen wurden anschließend die Zellkerne mittels Hämalaun-Färbung visualisiert und die Objektträger mit einem Deckgläschen versehen.

3.2.2.6.3 Sirius Red/Fast Green-Färbung

Zum Nachweis von Fibrose in Formalin-fixiertem murinen Lebergewebe wurde eine Sirius Red/ Fast Green-Färbung durchgeführt. Bei dieser Färbung werden Kollagenstränge rötlich angefärbt. Hierfür wurden 10 µm Paraffinschnitte von murinem Lebergewebe hergestellt, deparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte eine 30-minütige Inkubation in gesättigter Pikrinsäure mit 0,1% Sirius Red und 0,1% Fast Green Reagenzien. Die Objektträger wurden anschließend mit einem Deckgläschen versehen.

3.2.3 Zellkulturmethoden

3.2.3.1 Kultivierung von humanen und murinen Melanomzelllinien und normalen humanen Melanozyten

Alle humanen und murinen Melanomzelllinien wurden in DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 8% CO₂ kultiviert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellen wurden in DMEM resuspendiert und durch Zentrifugation für 4 min bei 1200 rpm pellettiert. Nach Resuspension in DMEM mit 10% FKS wurden die Zellen in einer Verdünnung zwischen 1:5 und 1:10 in neue Zellkulturflaschen ausgesät und das Medium bei Bedarf jeden zweiten Tag erneuert. Normale humane epidermale Melanozyten (NHEM) wurden in Melanozyten-Medium kultiviert und wie oben beschrieben passagiert. Bei Bedarf erfolgte zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel.

3.2.3.2 Isolierung und Kultivierung von Melanozyten aus neugeborenen Mäusen

Zur Isolierung von Melanozyten aus neugeborenen Mäusen wurden diese mit einem Alter von 1 bis maximal 3 Tagen durch Enthauptung getötet und bis zur Präparation auf Eis inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Durch jeweils einminütiges Schwenken in einer Iod-haltigen Desinfektionslösung und in 70% Ethanol wurden die Körper desinfiziert. Zwischen diesen Schritten wurden die Körper für jeweils 1 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Gliedmaßen abgetrennt, die Haut als komplettes Stück abgezogen und über Nacht bei 4°C in einer Dispaselösung (5 mg/mL in PBS, sterilfiltriert) inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Epidermis durch Abziehen von der Dermis getrennt und in einer 6-well Schale für 5 min bei 37°C in Trypsin/EDTA (0,025% Trypsin in 0,02% EDTA/PBS) inkubiert. Die Reaktion wurde durch 3 mL Stopp-Medium (3.1.8.1) angehalten und die gelösten Zellen durch Zentrifugation (1200 rpm, 4min) pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in 10 mL Medium I (3.1.8.1) resuspendiert und in eine T75 Zellkulturschale ausgesät. Nach 3-5 Tagen Kultivierung wurden die Melanozyten durch Inkubation mit Trypsin für 1 min bei 37°C von den Keratinozyten getrennt. Nach Stoppen der Reaktion mit 3 mL Stopp-Medium und Zentrifugation (1200 rpm, 4 min) wurden die Zellen aus je zwei Tieren zusammen in 2 mL Medium II (3.1.8.1) in einem 6-well ausgesät und weiter kultiviert. Je nach Bedarf erfolgte ein- bis zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel. Das Protokoll zur Isolierung von primären murinen Melanozyten aus neugeborenen Mäusen wurde von Dr. Sebastian Franken (Institut für Biochemie und Molekulare Biologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt und leicht modifiziert.

3.2.3.3 Einfrieren und Auftauen von murinen und humanen Zellen

Zum Einfrieren von humanen und murinen Melanomzelllinien sowie von NHEM und primären melanozytären Zellen wurde diese durch Trypsinieren aus einer T75-Zellkulturflasche gelöst, pelletiert und in 5 mL des entsprechenden Kulturmediums bzw. Einfriermediums aufgenommen. Je 900 µL der Zellsuspension wurden in ein Cryoröhrchen überführt, in welches 900 µL entsprechendes kaltes Einfriermedium

(3.1.8.1) vorgelegt wurden. Die Zellen wurden für eine Stunde bei -20°C zwischengelagert und anschließend in -80°C überführt. Zur Langzeitlagerung diente flüssiger Stickstoff. Um Zellen aus der Lagerung in flüssigem Stickstoff aufzutauen, wurden diese im Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut und in ein Röhrchen mit 8 mL Kulturmedium überführt. Nach Zentrifugation für 4 min bei 1200 rpm wurden die Zellen im entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und in eine T25-Zellkulturflasche ausgesät. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

3.2.3.4 Transiente Transfektion von humanen Melanozyten

Die Transfektion von NHEM mit siRNAs erfolgte mittels Elektroporation unter Verwendung der Nucleofector®-Technologie (Firma Amaxa GmbH, Köln) und des Amaxa® NHEM-Neo Nucleofector® Kits der Firma Lonza (Köln). Pro Transfektionsansatz wurden 5×10^5 Zellen mit je 3 pmol siRNA den Herstellerangaben entsprechend transfiziert und anschließend im 6-well Format für weitere 5-7 Tage kultiviert. Nach Versuchsende wurde ein Teil der Zellen für die Isolierung von Gesamt-RNA (3.2.1.2) geerntet oder für den SA- β -Galaktosidase Assay (3.2.3.5) im 12-well Format ausgesät. Für die Messung im MIA-ELISA (3.2.2.5.1) wurden die Zellkultur-Überstände abgenommen und restliche zelluläre Bestandteile durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min entfernt.

3.2.3.5 Nachweis von seneszenten Zellen (SA- β -Galaktosidase-Färbung)

Für den Nachweis von seneszenten Zellen in Zellkultur wurden diese mit der Methode nach Dimri (Dimri et al., 1995) angefärbt. Dazu wurden die Zellen im 12-well Format in einer Dichte von 50000 Zellen pro well ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 3 min bei RT mit 3,7%iger Formaldehydlösung fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,5 mL der Färbelösung (3.1.8.3.5) bedeckt und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die deutlich im Zytosol blau-gefärbten Zellen am Mikroskop ausgezählt und deren Anzahl im Verhältnis zur Gesamtzellzahl bestimmt.

3.2.3.6 Messung von Proliferation mittels XTT

Die Messung der Proliferation von Melanozyten erfolgte unter Verwendung des XTT-Zellproliferations-Kits der Firma Roche (Mannheim) den Herstellerangaben entsprechend. Hierfür wurden mit siRNAs transfizierte Melanozyten (3.2.3.4) in einer 96-well Platte in verschiedenen Zellzahlen (1000 und 2000 Zellen) als Dreifach-Ansätze in Melanozyten-Medium ausgesät. Nach 2, 4 und 7 Tagen wurden je 50 µL XTT-Reagenz pro well zugesetzt. Der dabei entstehende Farbumschlag wurde jeweils nach 2 und 4 Stunden im ELISA-Reader bei 492 nm vermessen und die relative Proliferationsaktivität bestimmt.

3.2.3.7 Wundheilungs („Scratch“)-Assay

Die Migrationsfähigkeit von primären murinen Zellen wurde mittels Scratch-Assay untersucht. Hierfür wurden die Zellen in 6-well Platten ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Mit einer 1000 µL Pipettenspitze wurden je well 2 parallele Wunden im Zellrasen gesetzt. Um die abgekratzten Zellen zu entfernen, wurden die Zellen einmal mit Medium gespült, mit neuem Kulturmedium versetzt und weiter kultiviert. In 24h Abständen wurden anschließend die Lücken im Zellrasen an den gleichen Stellen überprüft und die Abstände ggf. vermessen.

3.2.3.8 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die Durchführung der Transmissions-Elektronenmikroskopie erfolgte in Kooperation mit Herrn Dr. Schröder (Zentrales Labor für Elektronenmikroskopie, Institut für Pathologie, Uniklinikum Regensburg). Hierfür wurden die Zellpellets zur Fixierung mit 1 mL Karnovsky-Reagenz (2,5% Glutaraldehyd/1% Paraformaldehyd) über Nacht bei Raumtemperatur überschichtet und wie beschrieben für die weitere Durchführung präpariert (Tatzel, et al., 2005).

3.2.4 Arbeiten mit Mäusen

3.2.4.1 *Haltungsbedingungen*

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in konventioneller Haltung nach den Richtlinien der Zentralen Tierlaboratorien (ZTL) der Universität Regensburg gezüchtet und versorgt. Der Hell-Dunkel-Wechsel erfolgte im Zwölf-Stunden Rhythmus und es herrschte eine konstante Temperatur von 22°C. Die Versorgung mit Wasser und Standard-Pelletfutter (Ssniff® R/M-H Cat. #V1534-0, Firma Ssniff, Soest) erfolgte *ad libidum*.

3.2.4.2 *Zuchtbedingungen und Genotypisierung*

3.2.4.2.1 *Erhaltungszucht Kreuzung von Mauslinien*

Die Zucht der bestehenden Mauslinien erfolgte nach den Empfehlungen des Tierärztlichen Dienstes der Universität Regensburg. Das Mindestalter bei Zuchtbeginn betrug 55 Tage.

3.2.4.2.2 *Kreuzung der Grm1(EPv)-transgenen Maus mit knockout-Mäusen*

Um homozygote Mauslinien aus der Kreuzung der Grm1(EPv)-Maus und BMP6-knockout- bzw. MIA-knockout-Mäusen zu generieren, wurden die resultierenden doppelt-heterozygoten Nachkommen wiederum miteinander gekreuzt. Nach der Genotypisierung (3.2.4.2.3, 3.2.4.2.4) wurden genetisch günstige Nachkommen miteinander verpaart, bis doppelt-homozygote Nachkommen zum Aufbau einer Linie erhalten wurden.

3.2.4.2.3 *Genotypisierung der Grm1(EPv)-transgenen Maus*

Ob Mäuse homozygote oder heterozygote Träger des Grm1-Transgenes sind, wurde mittels PCR bestimmt. Aus einer 3 mm großen Schwanzspitzen-Biopsie wurde die genomische DNA isoliert (3.2.1.1) und in 100 µL AE-Puffer eluiert. Anschließend wurde unter Verwendung der für das Grm1-Transgen spezifischen Primer (mGrm1(EPv), 3.1.7.1) eine PCR-Reaktion durchgeführt. Diese wurde auf dem

LightCycler II-System (3.2.1.5) etabliert und durchgeführt. In jeden Reaktionsansatz wurden 1 µL genomische DNA als *template* eingesetzt. Analog β-Aktin als „Housekeeper-Gen“, diente in diesem Fall zur Quantifizierung als Referenz das *Mia2*-Gen (mMia2/Exon2, 3.1.7.1). Hierfür wurde für jede Probe parallel zur *Grm1*-PCR ein *Mia2*-spezifischer PCR-Ansatz mitgeführt und das Ergebnis analog 3.2.1.5 mittels zugehöriger Software ausgewertet. Anschließend wurde für jede Probe das Verhältnis des errechneten *Grm1*-Signales in Abhängigkeit zum erhaltenen *Mia2*-Signal gesetzt. Um den Genotyp zu bestimmen, wurde dieses Verhältnis in Abhängigkeit einer internen Positivkontrolle (genomische DNA eines *Grm1*-homozygotes Tieres) gesetzt. Dabei wurde ein Verhältnis von 0,75-1,0 als homozygot, ein Verhältnis zwischen 0,25-0,75 als heterozygoten Träger des *Grm1*-Transgenes bestimmt. Verhältnisse unter 0,25 wurden als Nicht-Träger des Transgenes und damit als Wildtyp-Tier bewertet.

3.2.4.2.4 Genotypisierung auf MIA- und BMP6-Defizienz

Die Bestimmung des Genotyps im Hinblick auf das *Mia*- und das *Bmp6*-Gen wurde jeweils mittels PCR durchgeführt. Zunächst wurde analog 3.2.1.1 die genomische DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien isoliert. Anschließend wurde jeweils unter Verwendung der *Mia*-(mMia/WT; mMia/ko) bzw. *Bmp6*-(mBmp6/Exon2; mBmp6/MC1Neo) spezifischen Primer (3.1.7.1) eine PCR-Reaktion (3.2.1.4) durchgeführt. In jeden 50 µL Reaktionsansatz wurden 5 µL genomische DNA eingesetzt. Zur Auswertung wurde anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese (3.2.1.6) durchgeführt und die spezifischen Bandenmuster zur Bestimmung des Genotyps abgeglichen. Ein Beispiel für die Auswertung einer MIA-Genotypisierung ist unter Abbildung 3-1 gezeigt. Für jede Genotypisierung wurde die PCR standardmäßig einmal wiederholt.

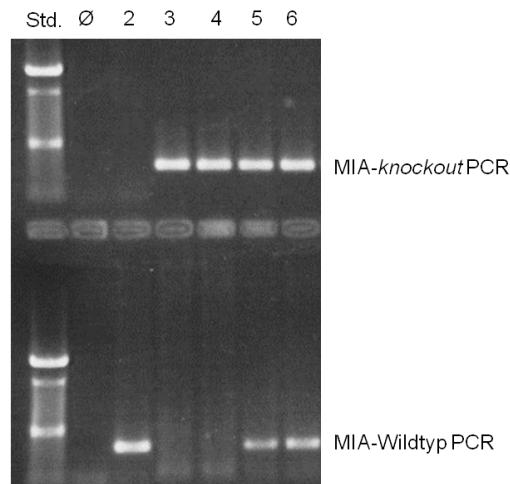


Abbildung 3-1: Beispiel für die Auswertung einer Genotypisierung auf MIA-Defizienz. Nach Durchführung der PCR-Reaktion unter Verwendung der Mia-spezifischen Primer wurden die Proben auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und in der Elektrophorese aufgetrennt. Nach Inkubation in einer Ethidiumbromidlösung wurde das Bandenmuster nach Abgleich mit einem mitgeführten DNA-Standard (Std.) ausgewertet. In diesem Beispiel war in der Negativkontrolle (ohne DNA-template) keine Bande sichtbar, bei Probe 2 handelte es sich um ein homozygoten Wildtyp-Tier, bei den Proben 3 und 4 um *Mia-knockout* Mäuse. Die Proben 5 und 6 wiesen in beiden PCR-Ansätzen spezifische Banden auf, daher handelte es sich um heterozygote Tiere.

3.2.4.3 Das Paigen-Futtermodell

Um die Rolle von Verfettung in der Melanomentstehung und -progression zu untersuchen, wurden Grm1-transgene Tiere in zwei Gruppen von jeweils 8-12 Tieren aufgeteilt. Beginnend mit einem Alter von 28 Tagen wurden die Tiere entweder mit der Standardernährung (Kontrollgruppe, 3.2.4.1) oder mit dem sogenannten Paigen-Futter ernährt. Die Paigen-Diät basiert auf dem Standardfutter für Ratten und Mäuse (Firma Ssniff, Soest) und enthält zusätzlich 1,25% Cholesterin, 0,5% Natriumcholat, 7,5% Schweineschmalz und 7,5% Kakaobutter. Die Ernährung von Nagern mit Paigen-Futter induziert eine Verfettung der Leber die in einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) und Fibrosierung resultiert (Paigen, et al., 1985; Matsuzawa, et al., 2007). Die Versorgung mit Wasser und Paigen-Futter erfolgte *ad libitum* bis zur Beendigung des Versuches.

3.2.4.4 Gewebeaufbereitung

3.2.4.4.1 Cryo-Konservierung von frischem Gewebe

Um murines Gewebe für eine spätere Verarbeitung zu konservieren, wurde dieses unmittelbar nach der Entnahme in Cryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.4.4.2 Herstellung von Paraffinmaterial

Für die immunhistochemischen Untersuchungen an Mausgewebe wurden Paraffinpräparate hergestellt. Dafür wurde das Gewebe nach Entnahme kurz in PBS gewaschen und in Einbettkassetten für 24h bei Raumtemperatur in einer 4% Formaldehyd/PBS-Lösung fixiert. Knochenhaltige Präparate wurden zur Entkalkifizierung zusätzlich für etwa sieben Tage in einer EDTA-Lösung (0,8 M, pH 7,4) inkubiert. Nach der Dehydrierung wurde das Gewebematerial in Paraffin eingebettet und bei Raumtemperatur gelagert. Für immunhistochemische Färbungen (3.2.2.6) wurden 5 µm Dünnschnitte hergestellt und auf Glasobjekträger aufgetragen.

3.2.5 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe der GraphPad Prism 4 Software (Firma GraphPad Software Inc., San Diego) durchgeführt. Alle Experimente wurden, mit Ausnahme der Tierversuche, in mindestens zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert bzw. prozentualer Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt. Die Berechnung auf signifikante Veränderungen der Ergebnisse zwischen den Versuchsgruppen wurde mittels des Student's t-Tests durchgeführt. Ein *P*-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Im Detail galt hierbei: *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$; ns: nicht signifikant.

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Ergebnisse ausführlich beschrieben und anschließend diskutiert. Der erste Teil der Ergebnisse befasst sich zunächst mit der genaueren Charakterisierung des Grm1-transgenen Mausmodells, welches für die Arbeiten der nachfolgenden drei Teile als Modellorganismus diente. Von den Ergebnissen aus den Teilen 4.1 und 4.3 wurden bereits Manuskripte ausgearbeitet und zur Veröffentlichung eingereicht. Für die Teile 4.2 und 4.4 sind noch weitere aufwendige Arbeiten mit Kooperationspartnern in Planung, bevor diese ebenfalls zur Veröffentlichung vorbereitet werden.

4.1 Nähere Charakterisierung des Grm1-transgenen Melanom-Mausmodells

Für den Hauptteil der folgenden Untersuchungen wurde die Grm1-transgene Melanommaus als Modellorganismus verwendet (Pollock, et al., 2003). Diese basiert auf einer melanozyten-spezifischen Überexpression des metabotropen Glutamaterezeptors 1 (Grm1) und einer daraus resultierenden Hyperproliferation von Melanozyten. Es kommt zunächst zur Entstehung von hyperpigmentierten Läsionen an den unbehaarten Hautregionen wie Schwanz, Ohren und Perianalregion. Diese entwickeln sich bei allen Tieren im Alter von 4-6 Monaten zu stark pigmentierten Melanomen. Im weiteren Verlauf sind die näheren Lymphknoten sowie teilweise das umgebende Gewebe von Infiltrationen betroffen (siehe 2.1.7.2). Da für die Untersuchungen in den Abschnitten 4.2 bis 4.4 eine sehr genaue Dokumentation der Melanomentwicklung und -progression nötig war, wurde das Tumorwachstum der Tg(*Grm1*)EPv Maus intensiv beobachtet und charakterisiert. Dabei konnten einige neue Erkenntnisse über das Mausmodell gewonnen und in die eigentlichen Untersuchungen mit einbezogen werden. Diese Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt kurz dargestellt.

4.1.1 Dokumentation von Tumorentstehung und -progression

Humane Tumorerkrankungen werden bei der Diagnosestellung mit Hilfe von etablierten Klassifikationssystemen beurteilt. Diese beschreiben die Größe und Ausbreitung eines Primärtumors sowie die Stufe der Tumorprogression und sind für die Prognose und die folgenden Therapiemaßnahmen entscheidend (siehe 2.1.2). Da es bei der Grm1-transgenen Mauslinie häufig nicht zur Entstehung von gut abgegrenzten Melanomen kommt und das Vermessen der Tumore nicht möglich ist, wurde für die folgenden Versuche ein geeignetes Klassifikationssystem entwickelt. Ziel war es dabei, den genauen Übergang vom Nävus zum Melanom und damit den Beginn des Melanomwachstums („Tumor-onset“) sowie die Tumorprogression eindeutig zu beschreiben. Es wurde daher ein 6-Punkte-System entwickelt, welches alle äußerlich beurteilbaren Tumorstadien an Ohren, Schwanz und Anus beschreibt. Um alle möglichen Stufen des Tumorwachstums abzudecken, wurde die Einteilung an der CYLD-defizienten Grm1-transgenen Mauslinie entwickelt. Diese wird ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe gezüchtet und zeichnet sich durch ein deutlich verfrühtes und verstärktes Tumorwachstum im Vergleich zur Grm1/Wildtyp Mauslinie aus (unveröffentlichte Daten). Wie in Abbildung 4-1 gezeigt, beschreibt Grad 1 ein tastbares, jedoch noch nicht sichtbares Melanomwachstum. Handelt es sich um Grad 2 oder 3, finden sich sehr kleine bzw. bereits klar sichtbare Tumore. Die Grade 4 und 5 beschreiben deutlich bzw. stark verdickte Ohren, Verdickungen an der Perianalregion sowie knotenartige Tumoren am Schwanz. Extremes Tumorwachstum mit Gefahr von Ulzerationen wurde schließlich mit Schweregrad 6 beurteilt. Dieses System wurde in den Kreuzungsversuchen mit den MIA-(siehe 4.2) und BMP6-defizienten (siehe 4.3) Mäusen sowie im Paigenfutter-Versuch (siehe 4.4) in die Analysen mit einbezogen.

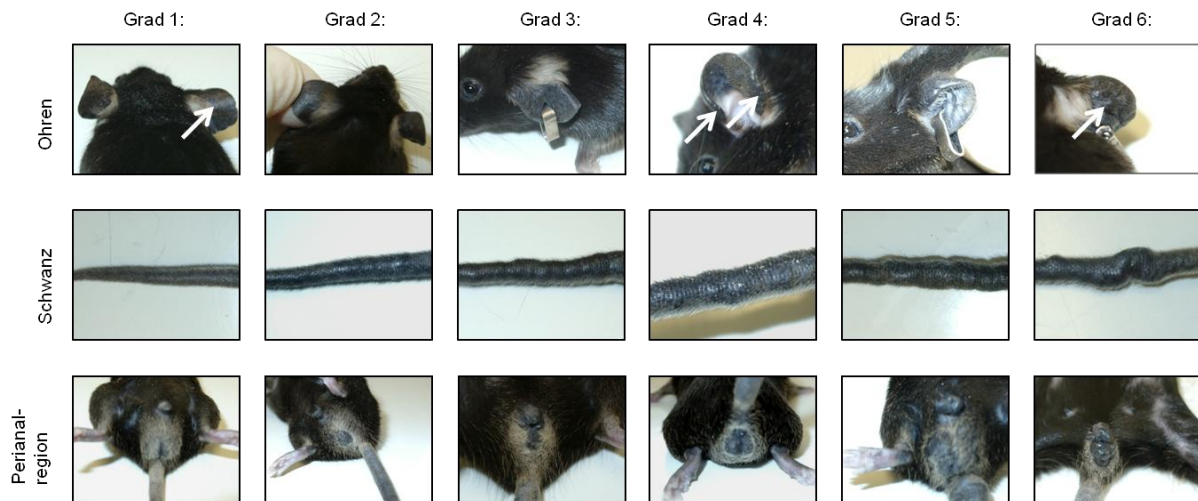


Abbildung 4-1: „Grading“-System zur Beschreibung und Charakterisierung des Tumorwachstums an Ohren, Schwanz und Perianalregion von Grm1-transgenen Melanommäusen. Schweregrad 1 beschreibt tastbares, jedoch noch nicht sichtbares Melanomwachstum. Bei Grad 2 und 3 finden sich einzelne, sehr kleine bzw. zahlreiche klar erkennbare kleine Knoten und Erhebungen. Die Ohren haben eine ledrig-derbe Konsistenz bzw. sind verdickt. Grad 4 beschreibt deutlich verdickte Ohren bzw. deutlich knotenartige Tumoren. Stark verdickte Ohren oder große Tumoren am Schwanz oder Anus wurden mit Stufe 5 bewertet, extremes Tumorwachstum mit Gefahr von Ulzerationen mit Schweregrad 6.

4.1.2 Unpigmentierte disseminierte Melanomzellen im Grm1-Modell

Neben dem Wachstum der Primärtumore an der Haut wurden die inneren Organe histologisch auf das Vorhandensein von Pigment und pigmentierten Zellen untersucht. Pollock und Kollegen fanden pigmentierte Zellen in den inguinalen Lymphknoten und in der Milz, jedoch nicht in fernen Lymphknoten oder in den Organen (Pollock, et al., 2003). Wie die repräsentativen immunhistochemischen Färbungen in Abbildung 4-2 zeigen, konnten wir diese Ergebnisse in unseren Analysen bestätigen. Die deutlich pigmentierten Tumorzellen aus den Primärtumoren an Ohren, Schwanz und Anus fanden sich auch in den inguinalen Lymphknoten und in der Milz. Zusätzlich konnten bei unseren Analysen jedoch auch einzelne pigmentierte Zellen in der Lunge nachgewiesen werden (Abbildung 4-2, Lunge). In anderen Organen wie Leber und Nieren wurden im HE-Schnitt keine pigmentierten Zellen gefunden.

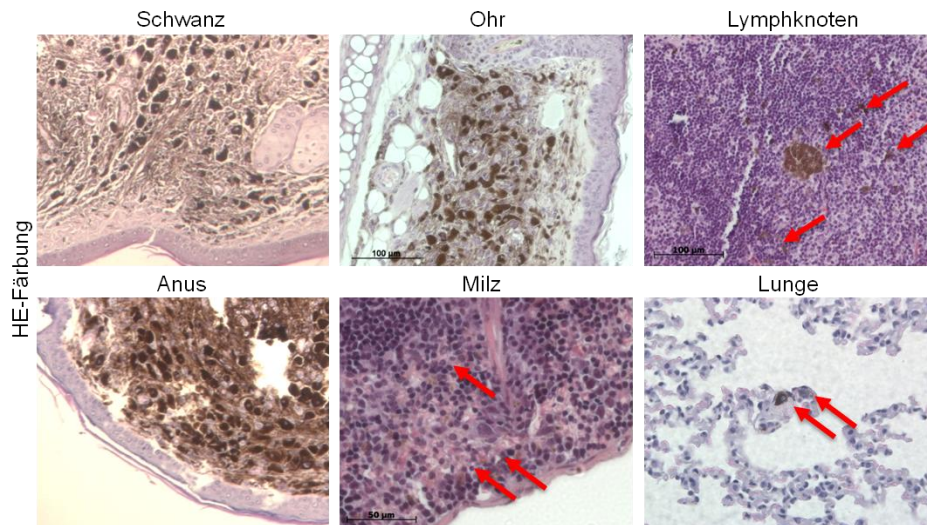


Abbildung 4-2: Hämalaun/Eosin (HE)-Färbung von Schwanz, Ohr, inguinalen Lymphknoten, Anus, Milz und Lunge aus Grm1-transgenen Mäusen. Im Schwanz, in den Ohren und im Anus ist die Ansammlung stark pigmentierter Melanomzellen in der Dermis deutlich erkennbar. In den Lymphknoten und in der Milz finden sich stark pigmentierte Areale sowie eine Vielzahl an pigmentierten Tumorzellen (Pfeile). In den Lungen von Grm1-transgenen Mäusen wurden ebenfalls vereinzelt pigmentierte Zellen und Melanin-Einlagerungen detektiert (Pfeile).

Entgegen der ursprünglichen Annahme wiesen der Melaningehalt sowie die Morphologie der pigmentierten Zellen in der Lunge auf das Vorhandensein von metastasierten Melanomzellen auch in den fernen Organen hin. Diese traten sehr vereinzelt auf, daher sollte im nächsten Schritt ein sehr sensibler Nachweis für disseminierte Tumorzellen etabliert werden. Da alle melanozytären Zellen dieses Mausmodells an der Zellmembran den metabotropen Glutmatrezeptor aufweisen sollten, war es das Ziel, einen gegen den extrazellulären Bereich des Moleküls gerichteten Antikörper für FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) Analysen und für den Nachweis in der Immunhistochemie zu etablieren. Während der Nachweis im FACS noch nicht mit ausreichender Spezifität etabliert werden konnte (Daten nicht gezeigt), waren die immunhistochemischen Färbungen (3.2.2.6.2) erfolgreich. In der anti-Grm1 Färbungen an Lymphknoten und Milz zeigte sich, dass neben den pigmentierten Melanomzellen zahlreiche weitere Zellen eine starke Grm1-Expression aufweisen (Abbildung 4-3 A). Um die Spezifität des Grm1-Antikörpers sicherzustellen, wurden Organe mit Grm1-positiven Zellen zusätzlich mit einem TRP2-Antikörper angefärbt (3.2.2.6.2). TRP2 (DCT) ist spezifisch in Melanozyten

exprimiert und speziell in diesem Mausmodell der Aktivator des *Grm1*-Transgenes. Dabei zeigten, wie in der anti-Grm1 Färbung, zahlreiche Zellen eine stark positive spezifische Färbung (Abbildung 4-3 B). Mit der Grm1-Färbung konnte somit ein spezifischer und sensibler Nachweis für Metastasen in der Grm1-transgenen Maus etabliert werden.

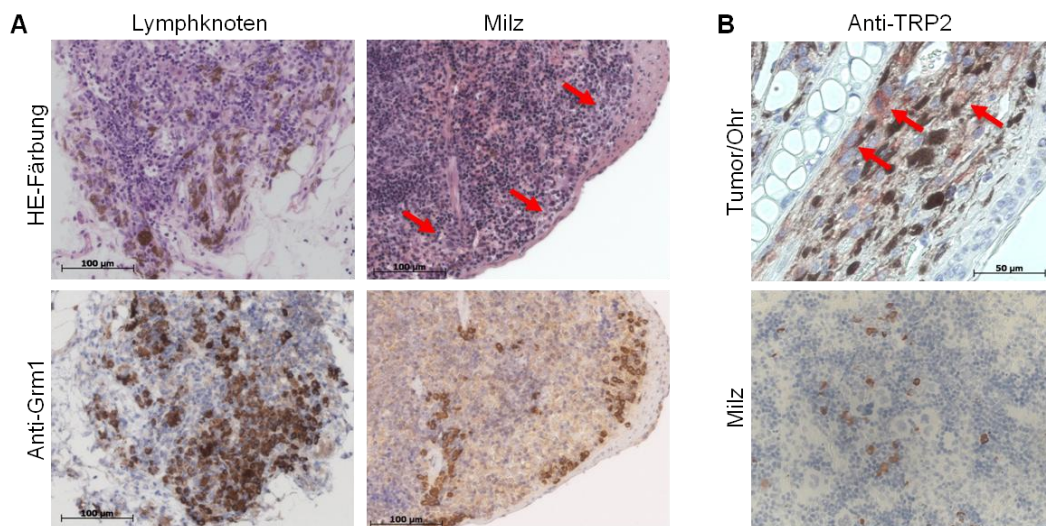


Abbildung 4-3: Etablierung eines Nachweises von disseminierten Melanomzellen in den Organen von Grm1-transgenen Melanommäusen. (A) In der HE-Färbung finden sich zahlreiche pigmentierte Tumorzellen in den Lymphknoten und der Milz von Grm1-Tieren. Eine Grm1-spezifische immunhistochemische Färbung zeigte, dass viele metastasierte Melanomzellen unpigmentiert sind. (B) Die Spezifität der anti-Grm1 Färbung konnte durch eine TRP2-spezifische Färbung bestätigt werden. Die stark pigmentierten Melanomzellen im Ohr (Pfeile) sowie Grm1-exprimierende Zellen in der Milz und zeigen eine deutliche TRP2-Expression.

Die Ergebnisse dieser Färbungen wiesen darauf hin, dass es bei der Grm1-transgenen Maus zu einer höheren Metastasierungsrate kommt, als bisher angenommen. In den Lymphknoten und in der Milz waren viele dieser Zellen noch stark pigmentiert. Aufgrund der großen Anzahl an Grm1-positiven Zellen lag die Vermutung nahe, dass disseminierte Zellen in den fernen Organen unpigmentiert sind. Um dies zu bestätigen, wurden Lungen von Grm1-transgenen Tieren auf das Vorhandensein von Grm1-positiven Zellen untersucht und in der HE-Färbung (3.2.2.6.1) zusätzlich histopathologisch beurteilt. Repräsentative Bilder sind in Abbildung 4-4 A dargestellt. Durch das pathologische Institut des Uniklinikums Regensburg konnte hierbei bestätigt werden, dass es sich bei den Grm1-positiven

Zellen in der Lunge um atypische Zellen und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit um disseminierte Melanomzellen handelt. Um diese Zellen zu quantifizieren, wurden pro Tier und Gewebeschnitt je 15 Gesichtsfelder unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und auf die durchschnittliche Anzahl positiver Zellen pro Gesichtsfeld normalisiert. Dabei zeigte sich, dass in nahezu allen Grm1-transgenen Mäusen unpigmentierte Melanomzellen in der Lunge nachweisbar sind. Deren Anzahl variierte zwischen einem minimalen Durchschnittswert von 0,3 Zellen pro Gesichtsfeld und einem maximalen Durchschnittswert von 16 Zellen pro Gesichtsfeld (Abbildung 4-4 B).

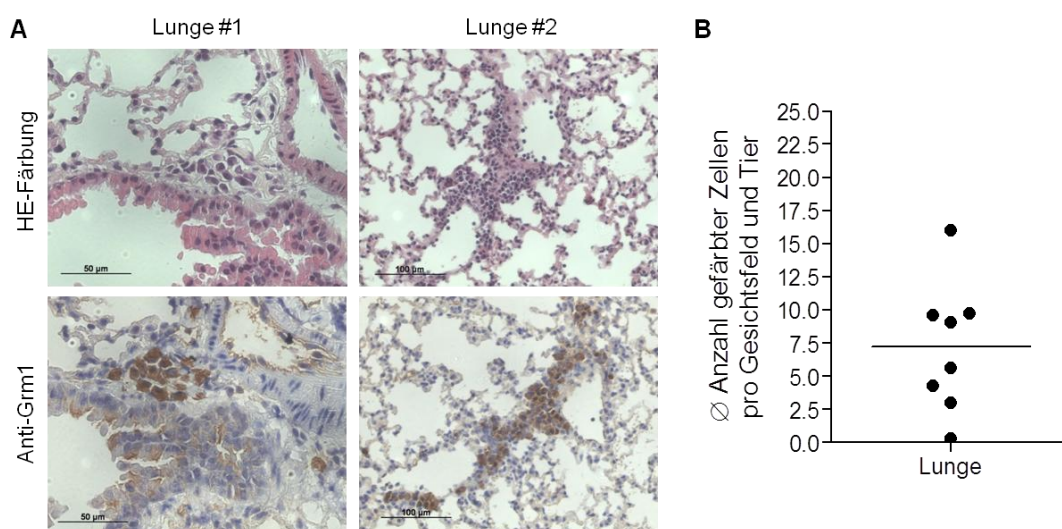


Abbildung 4-4: Nachweis und Quantifizierung von unpigmentierten Melanomzellen in Grm1-transgenen Mäusen am Beispiel der Lunge. (A) Die Lungen von Grm1-transgenen Tieren wurden mit einem Grm1-spezifischen Antikörper immunhistochemisch angefärbt. In der Grm1-Färbung sind deutlich gefärbte Zellen erkennbar. In der zusätzlich angefertigten HE-Färbung sind die Tumornester aus atypischen Zellen gut erkennbar, diese weisen jedoch keine Pigmentierung auf. (B) Die Quantifizierung der disseminierten Tumorzellen in den Lungen von Grm1-transgenen Mäusen nach Grm1-spezifischer Färbung ergab einen Durchschnittswert von 7,2 metastasierten Zellen pro Gesichtsfeld.

Die Analysen wurden auch in der Leber von Grm1-transgenen Tieren durchgeführt. Hier ergab die Quantifizierung eher niedrige Werte, da die durchschnittliche Anzahl von Grm1-positiven Zellen im Mittel weniger als eine Zelle pro Gesichtsfeld betrug. Dies bedeutet, dass in der Mehrzahl der ausgezählten Areale keine metastasierte Zelle gefunden wurde. In den Nieren wurden ebenfalls keine Grm1-positiven Zellen gefunden (Daten nicht gezeigt). Im Gehirn kann die Grm1-Immunhistochemie

aufgrund der hohen physiologischen Expression des Rezeptors nicht angewendet werden. Vorläufige Analysen mittels HE- und anti-TRP2 immunhistochemischen Färbungen haben bisher keine Hinweise auf Metastasen im Gehirn ergeben (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde das Knochenmark auf disseminierte Tumorzellen untersucht. Hierfür wurde eine qRT-PCR unter Verwendung der Grm1-spezifischen Primer (3.1.7.2) durchgeführt. Dabei konnte in den Knochenmark-Proben von Grm1-transgenen Tieren eine deutliche Grm1-Expression detektiert werden, welche im Knochenmark von normalen C57Bl/6-Mäusen nicht nachweisbar war (Abbildung 4-5 A). Die Spezifität des Signals konnte mittels Agarose-Gelelektrophorese bestätigt werden (Abbildung 4-5 B). Interessanterweise zeigten jüngere Grm1-transgene Mäuse (Abbildung 4-5 A: Grm1 KM#1 und KM#2) zum Zeitpunkt des ungefähren Tumor-onsets ebenfalls eine Expression von Grm1, jedoch in einer deutlich geringeren Intensität, als Tiere mit bereits sichtbarem Tumorwachstum (Grm1 KM#3 bis KM#5). Die Disseminierung von Melanomzellen beginnt demnach bereits sehr früh während der Tumorentstehung.

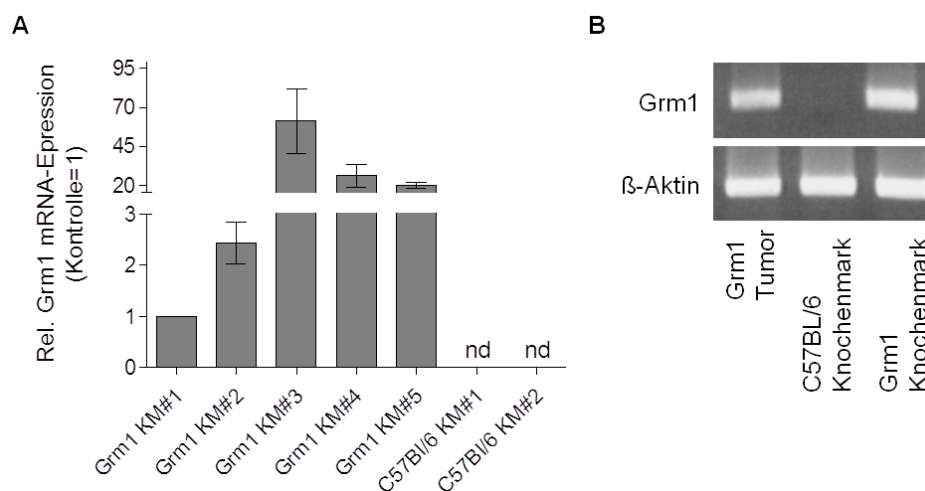


Abbildung 4-5: Nachweis von disseminierten Melanomzellen im Knochenmark von Grm1-transgenen Mäusen. (A) Mittels qRT-PCR konnte eine deutliche Grm1 mRNA-Expression im Knochenmark von Grm1-transgenen Melanommäusen nachgewiesen werden. Im Knochenmark von normalen C57Bl/6-Mäusen wurde keine Grm1-Expression gemessen. (B) Die PCR-Produkte aus (A) wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf ihre Größe analysiert. Alle positiven Signale waren spezifisch, als Kontrolle diente das PCR-Produkt aus einer Grm1-Tumorprobe.

Insgesamt konnte hiermit ein Nachweis für disseminierte Melanomzellen im Grm1-transgenen Mausmodell etabliert werden. Dabei wurden metastasierte Melanomzellen in den inguinalen Lymphknoten, in der Milz, in der Lunge und in geringem Maße in der Leber gefunden. Diese Daten zeigen zum ersten Mal, dass diese Zellen, im Gegensatz zu den Primärtumoren häufig keine Pigmentierung mehr aufweisen. In den nachfolgenden Fragestellungen dieser Arbeit wurden diese Ergebnisse mit berücksichtigt.

4.1.3 Isolierung und Charakterisierung einer immortalen melanozytären Zelllinie aus der Grm1-transgenen Maus

Da in den folgenden Fragestellungen dieser Arbeit die Rolle von Faktoren in der frühen Melanomentstehung am Modell der Grm1-transgenen Maus untersucht wurde, waren langfristig auch Untersuchungen an primären Melanozyten aus den jeweiligen Mauslinien vorgesehen. Hierfür sollte ein von Kooperationspartnern zur Verfügung gestelltes Protokoll etabliert werden. Dabei wurden primäre Melanozyten aus der Haut von maximal 3 Tage alten neugeborenen Grm1-Mäusen isoliert und kultiviert (3.2.3.2). In mehreren durchgeführten Versuchen wurden das Wachstum und die Morphologie der Zellen dokumentiert. In den meisten Fällen konnte für einige Tage bis wenige Wochen eine deutlich pigmentierte reine Melanozyten-Kultur etabliert werden. Während der weiteren Kultivierung zeigten sich häufig morphologische Veränderungen mit unterschiedlichen Pigmentierungsgraden (Abbildung 4-6). Eine längerfristige Kultivierung war jedoch in den meisten Fällen nicht möglich. Dies war vermutlich zum einen auf die teilweise extreme Pigmentierung zurückzuführen. Zum anderen ist bekannt, dass primäre Zellkulturen nur eine bestimmte Zeitspanne mit einer begrenzten Anzahl von Teilungen wachsen und überleben können.

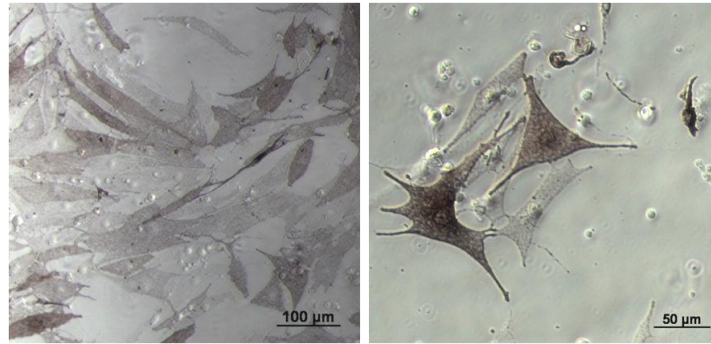


Abbildung 4-6: Etablierung der Kultivierung von primären murinen Melanozyten aus neugeborenen Grm1-transgenen Mäusen. Nach einigen Tagen in Kultur zeigten die isolierten Melanozyten eine unterschiedlich starke Pigmentierung. Die Zellen wiesen eine breite Morphologie mit dendritischen Ausläufern auf und standen in lockerem Kontakt zu den umgebenden Melanozyten.

In einem bisher einzelnen Versuch (Isolierungscharge „E3101“) kam es nach etwa 21 Tagen Kultivierung zu einer schnellen Expansion von unpigmentierten, dendritischen Zellen. Diese konnten innerhalb weniger Tage in einen größeren Maßstab subkultiviert werden und zeigten auch die darauffolgenden Wochen ein schnelles Wachstum. Auffallend war dabei, dass sich während dieser Zeitspanne häufig die Morphologie und Größe der Zellen veränderte (Abbildung 4-7).

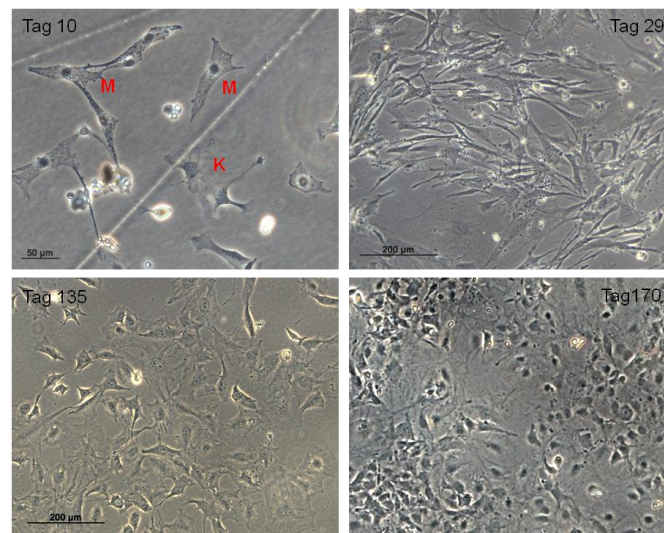


Abbildung 4-7: Kultivierung von primären murinen Melanozyten (Charge „E3101“). Kurz nach der Isolierung waren neben einigen Keratinozyten (K) auch deutlich pigmentierte melanozytäre Zellen (M) sichtbar (Tag 10). Während der weiteren Kultivierung (Tag 29) dominierten schnell wachsende, unpigmentierte Zellen die Kultur. Diese zeigten innerhalb mehrerer Monate morphologische Änderungen und konnten in großer Zahl weiter kultiviert werden (Tag 135 und Tag 170).

Nach einigen Monaten konnten die Zellen in so großen Mengen gezüchtet werden, dass diese für die langfristige Lagerung bei -80°C und in flüssigem Stickstoff eingefroren werden konnten und für weitere Analysen ausreichten. In qRT-PCR Analysen (3.2.1.5) wiesen die Zellen eine schwache Expression des Glutamatrezeptors auf, was zur Annahme führte, dass in der Kultur melanozytäre Zellen enthalten waren (Abbildung 4-8 A). Primäre Melanozyten werden mit TPA kultiviert, was in Zellkulturen eine Steigerung der Proliferation aufgrund der Aktivierung des MAPK-Signalweges bewirkt. Bei der Kultivierung mit TPA-freiem Medium zeigten E3101-Zellen im Vergleich zum Medium mit TPA keinen Unterschied in Wachstum und Morphologie. Demnach waren diese Zellen auch ohne diesen Zusatz in der Lage zu proliferieren und wiesen vermutlich einen konstitutiv aktiven MAPK-Signalweg auf. Dies war ein deutlicher Hinweis darauf, dass es sich um transformierte, immortale Zellen handelte. Mittels Western Blot-Analyse (3.2.2.4) konnte bestätigt werden, dass E3101-Zellen hohe Mengen an phosphoryliertem ERK1/2 und damit einen hochaktiven MAPK-Weg aufwiesen (Abbildung 4-8 B).

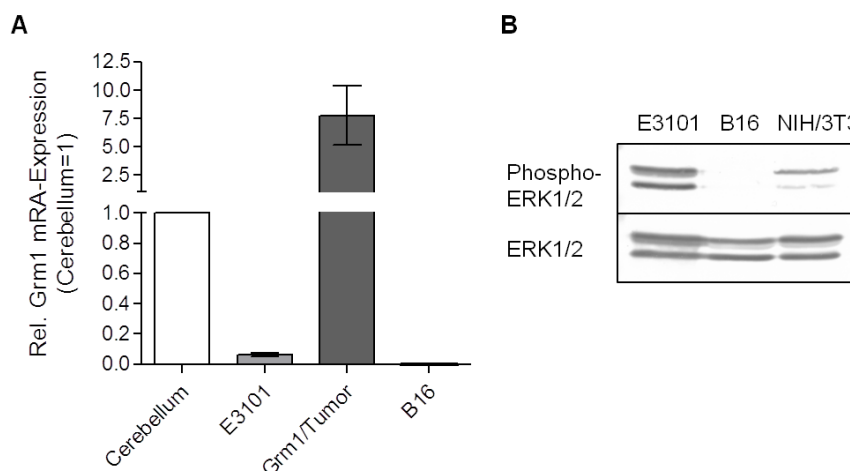


Abbildung 4-8: Untersuchung der Grm1-Expression und der Aktivität von ERK1/2 (p44/42 MAPK) in E3101-Zellen. (A) Mittels qRT-PCR Analyse zeigte sich eine schwache, aber eindeutige Grm1 mRNA-Expression in E3101-Zellen. Murines Cerebellum und eine Grm1-Tumorprobe wurden als Positivkontrolle verwendet. Die murine Melanomzelllinie B16 zeigte keine Expression des Glutamatrezeptors 1. (B) Im Vergleich zu B16- und NIH/3T3-Zellen wies die E3101-Zelllinie in der Western Blot-Analyse eine hohe Phosphorylierungsrate von ERK1/2 auf. Als Ladekontrolle diente unphosphoryliertes ERK1/2.

Aufgrund der fehlenden Pigmentierung konnten die Zellen nicht mehr eindeutig einem melanozytären Ursprung zugeordnet werden. Nach einigen Monaten Kultur wiesen diese zudem in der qRT-PCR Analyse weder eine TRP2- noch eine Grm1-Expression oder andere Melanozyten-assoziierte Marker auf (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde eine Charakterisierung mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie in Kooperation mit Herrn Dr. Schröder (Zentrales Labor für Elektronenmikroskopie, Institut für Pathologie, Uniklinikum Regensburg) durchgeführt. Die Vorbereitung der Präparate und die Durchführung erfolgten analog 3.2.3.8. Die Pigmentbildung erfolgt in melanozytären Zellen in den Melanosomen. Diese Organellen entwickeln sich aus drei Vorstufen (Prä-Melanosomen Stufen I bis III) zu den reifen Melanosomen in denen das Pigment Melanin gebildet wird (Stufe IV). Die reifen, pigmenthaltigen Melanosomen werden anschließend über dendritische Ausläufer zu den umgebenden Keratinozyten transportiert, um diese mit Melanin zu versorgen. Je nach Differenzierungsgrad einer Zelle finden sich unterschiedliche Stadien von Melanosomen. Da die E3101-Zelllinie keine Pigmentierung aufwies, erfolgte die Suche nach Prä-Melanosomen unterschiedlicher Stadien. Dabei wurden zahlreiche Organellen detektiert, bei denen es sich um unreife Prä-Melanosomen der Stufen I bis II handelte (Abbildung 4-9, Vergrößerungen 5000x und 8000x). In wenigen Fällen konnten jedoch auch Melanosomen der Stadien III bis IV identifiziert werden. Diese wiesen die charakteristische ovale Form mit stapelförmig eingelagerten Filamentstrukturen auf (Abbildung 4-9, Vergrößerungen 40000x und 80000x). Damit konnte bewiesen werden, dass es sich hierbei um Zellen melanozytären Ursprungs handelte.

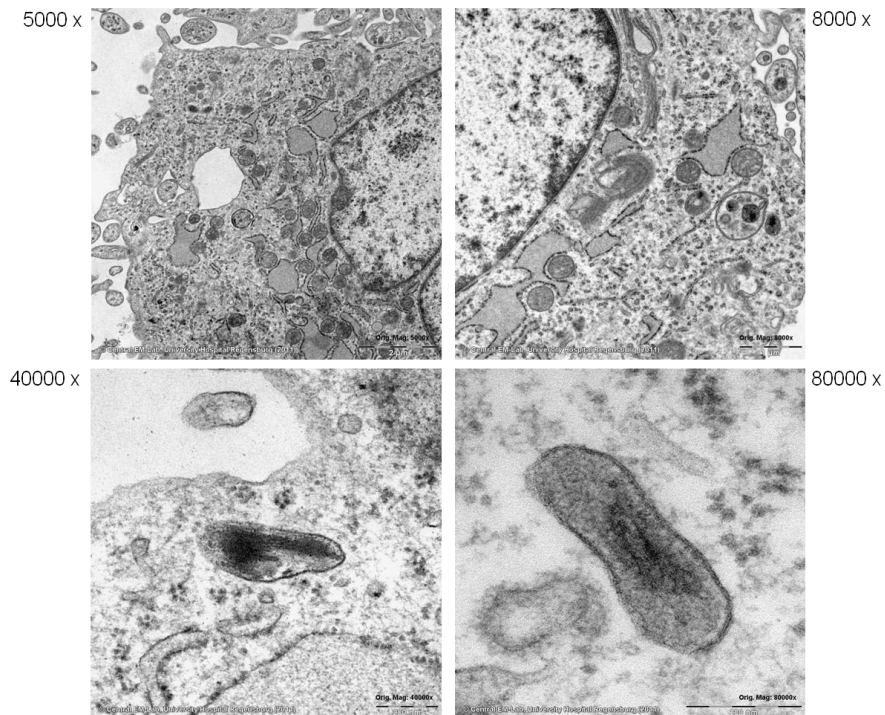


Abbildung 4-9: Transmissions-Elektronenmikroskopie von immortalen murinen „E3101“-Zellkulturen. Durch den Nachweis von unreifen Melanosomen der Stufen I und II (Vergrößerungen 5000x und 8000x) sowie von Stufe III-IV Melanosomen konnte der melanozytäre Ursprung der Zellen eindeutig nachgewiesen werden.

Um die Zellen näher zu charakterisieren, wurden erste funktionelle Analysen durchgeführt. Im „Scratch“-Assay (3.2.3.7) war der eingefügte Spalt im Zellrasen bereits nach 24h wieder vollständig von eingewanderten Zellen besetzt. E3101-Zellen wiesen demnach ein hohes Migrationsvermögen auf (Abbildung 4-10). Des Weiteren wurden erste 3D-Sphäroid-Versuche durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Zellen in der Lage sind, kompakte Sphäroide zu bilden (Daten nicht gezeigt).

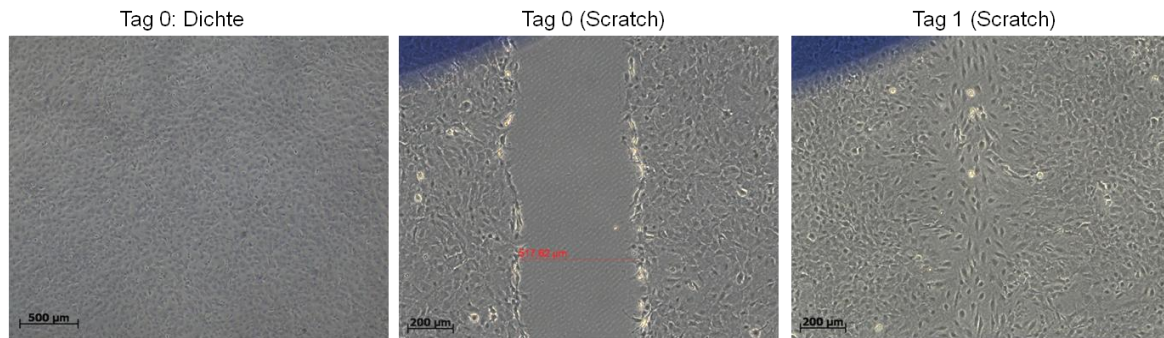


Abbildung 4-10: Wundheilung-Assay zur Analyse der Migrationsaktivität. E3101-Zellen wurden in hoher Dichte kultiviert (Tag 0). Mit einer 1000 µL Pipettenspitze wurden je Kulturansatz zwei parallele „Wunden“ gesetzt (Tag 0, Scratch) und weiter kultiviert. Nach 24h waren diese wieder vollständig mit Zellen ausgefüllt (Tag 1, Scratch).

Insgesamt konnte eine immortale Melanom-ähnliche Zelllinie aus der Grm1-transgenen Maus etabliert werden, welche nach der weiteren Charakterisierung ein interessantes murines Zellkulturmodell für weitere Studien darstellt.

4.2 *In vivo* Untersuchungen zur Rolle von MIA in der Melanomentstehung

Die Rolle des sezernierten Moleküls MIA (*melanoma inhibitory activity*) im Melanom wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits intensiv untersucht und beschrieben (siehe 2.2.3). Da auch benigne Nävi eine leicht erhöhte MIA-Expression im Vergleich zu normaler Haut aufweisen, wird vermutet, dass MIA bereits in der frühen Entstehung des Melanoms eine Rolle spielt. Konkrete Hinweise darauf ergaben sich durch die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an MIA-defizienten HMB2 Melanomzellen, bei denen durch das Ausschalten von MIA auch andere Melanom-assoziierte Faktoren beeinflusst wurden (Poser, et al., 2004; Tatzel, et al., 2005; Schiffner, et al., 2011). Unsere Hypothese war es daher, dass MIA nicht nur in der Metastasierung des Melanoms eine Rolle spielt sondern über die Regulation weiterer Moleküle auch in die Entstehung des Tumors involviert ist. Dieser Aspekt sollte im zweiten Teil dieser Arbeit mittels *in vivo* Analysen anhand der Grm1-transgenen Maus und des MIA-defizienten Mausmodells durchgeführt werden.

4.2.1 Etablierung einer MIA-defizienten Grm1-transgenen Mauslinie

Im ersten Schritt sollte eine MIA-defiziente Grm1-transgene Melanommauslinie generiert werden. Sowohl die MIA-defiziente Maus (3.1.5.2.1) als auch die Grm1-transgene Maus (3.1.5.1.1) wurden bereits in unserer Arbeitsgruppe gezüchtet. Durch Kreuzung der beiden Mauslinien wurden zunächst für beide Genloci heterozygote Nachkommen generiert, welche wiederum miteinander gekreuzt wurden (3.2.4.2.2). Alle resultierenden Jungtiere wurden genotypisiert (3.2.4.2.3, 3.2.4.2.4). Durch sukzessive Kreuzung geeigneter Nachkommen wurden schließlich doppelt-homozygote Tiere erhalten und eine MIA-defiziente Grm1-Linie (Grm1/MIA-/-) gezüchtet. Um die Eignung des Mausmodells für die vorliegende Fragestellung zu untersuchen, wurden zunächst Melanomproben aus Grm1/MIA+/+ und Grm1/MIA-/- Mäusen auf die Expression von MIA mittels qRT-PCR (3.2.1.5) untersucht. Tumore aus Grm1/MIA+/+ Tieren wiesen, ähnlich wie die murine Melanomzelllinie B16 eine hohe MIA-Expression auf, während diese in Tumoren aus der MIA-negativen Mauslinie nicht nachweisbar war (Abbildung 4-11). Das Mausmodell war somit geeignet, um die Rolle von MIA in der frühen Melanomentstehung zu untersuchen.

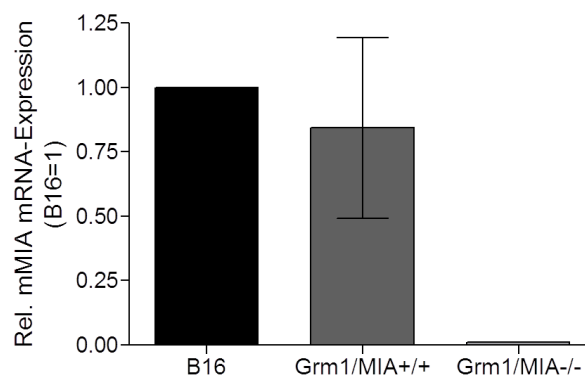


Abbildung 4-11: Analyse der murinen MIA (mMIA) mRNA-Expression in Tumoren aus Grm1/MIA+/+ und Grm1/MIA-/- Mäusen mittels qRT-PCR. Murines MIA-Protein ist in Tumoren aus der Grm1/MIA+/+ Mauslinie hoch exprimiert. In Tumoren von MIA-defizienten Grm1 Mäusen ist keine MIA mRNA-Expression nachweisbar. Die murine Melanomzelllinie B16 wurde als Positivkontrolle verwendet.

Anschließend wurden eine Grm1/MIA^{-/-} Versuchsgruppe sowie eine Grm1/MIA^{+/+} Kontrollgruppe gezüchtet. Jedes Tier wurde zur individuellen Unterscheidung mit einer Ohrmarke versehen.

4.2.2 Vergleichende Analyse von Tumorentstehung und Progression

Um die Rolle von MIA in der frühen Melanomentstehung *in vivo* zu untersuchen, wurde eine genaue wöchentliche Dokumentation des Melanomwachstums in den beiden Versuchsgruppen durchgeführt. Beginnend mit dem Alter von drei Wochen wurden hierzu bei jedem Tier einzeln alle äußerlichen Veränderungen an Schwanz, Ohren, Anus und gegebenenfalls an Augen und Schnauze dokumentiert. Der Beginn des Tumorwachstums („Tumor-onset“) wurde als das Alter in Tagen definiert, an dem zum ersten Mal das Wachstum von Melanomen detektiert wurde. Da zum Zeitpunkt dieses Versuches noch kein Klassifikationssystem zur Bestimmung der Stärke des Tumorwachstums (siehe 4.1.1) zur Verfügung stand, konnte hier ausschließlich der Übergang vom benignen zum malignen Tumorwachstum, jedoch noch keine Tumorprogression bestimmt werden. Ab Tumor-onset wurde das Melanomwachstum individuell bei jedem Tier für weitere 60 Tage verfolgt. Anschließend erfolgten die tierschutzgerechte Tötung und die Asservierung von Tumoren und Gewebeproben für spätere Analysen.

4.2.2.1 Vergleichende Dokumentation des Tumorwachstums

Alle bisherigen Studien zeigten deutlich, dass MIA im malignen Melanom als starkes Onkogen zur Progression des Tumors beiträgt (siehe 2.2.3). Im vorliegenden Versuch sollten MIA-defiziente Grm1-transgene Tiere daher ein verzögertes Melanomwachstum aufweisen. Entgegen dieser Erwartungen zeigte die Grm1/MIA^{-/-} Versuchsgruppe jedoch ein signifikant früheres Tumor-onset im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 4-12). Während das Melanomwachstum bei Grm1/MIA^{+/+} Mäusen im Schnitt bei 127,8 Tagen eintrat, betrug das mittlere Tumor-onset bei den MIA-defizienten Tieren 111,0 Tage. Dieser Unterschied betrug somit im Mittel mehr als 2 Wochen.

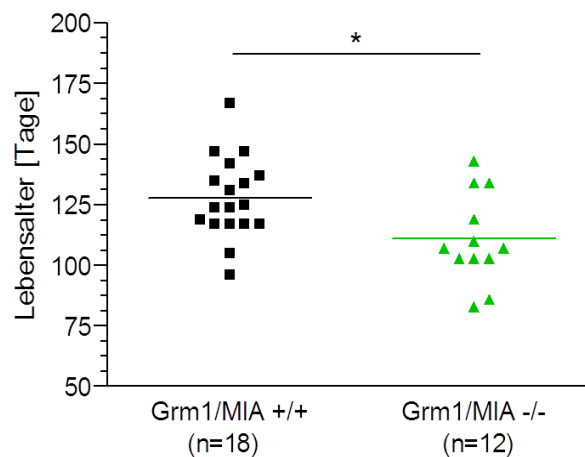


Abbildung 4-12: Bestimmung des Tumor-onsets bei Grm1/MIA-/- Tieren im Vergleich zur Grm1/MIA+/+ Kontrollgruppe. Im Vergleich zu Grm1/MIA+/+ Tieren wiesen MIA-defiziente Melanommäuse ein signifikant früheres Einsetzen des Melanomwachstums auf. Die Beobachtungen des Tumorwachstums erfolgten an Schwanz, Ohren und Perianalregion (* $P < 0,05$).

Dieses sehr überraschende Ergebnis zeigte, dass MIA in der frühen Melanomentstehung in den Grm1/MIA+/+ Mäusen eine wichtige Rolle spielt. Jedoch scheint es zu diesem Zeitpunkt noch keine onkogene Wirkung zu haben, sondern trägt eher zur Verzögerung des Melanom-onsets bei. Dieser interessante Aspekt wurde Verlauf der Studie noch näher untersucht (siehe 4.2.3).

4.2.2.2 Der Einfluss von MIA auf die Metastasierung von Melanomzellen

MIA fördert die Metastasierung von Melanomzellen. Um zu überprüfen, ob dies auch auf unser murines *in vivo* Modell übertragbar ist, wurden im nächsten Schritt alle Grm1/MIA+/+ und Grm1/MIA-/- Versuchstiere auf Lymph- und Fernmetastasen untersucht. Hierfür wurden die inneren Organe 60 Tage nach dem ersten Auftreten von Primärtumoren asserviert und mittels HE-Färbung und der spezifischen anti-Grm1 Färbung immunhistochemisch untersucht (3.2.2.6.1, 3.2.2.6.2). Repräsentative Beispiele sind in Abbildung 4-13 dargestellt. Wie bereits unter 4.1 beschrieben, konnten in den Grm1/MIA+/+ Tieren pigmentierte Zellen in den inguinalen Lymphknoten detektiert werden. Diese waren auch in der MIA-defizienten Versuchsgruppe vorhanden. Mittels der spezifischen anti-Grm1 Färbung konnten weitere, unpigmentierte Melanomzellen in den Lymphknoten nachgewiesen werden.

Insgesamt war jedoch kein Unterschied in der lymphogenen Metastasierung erkennbar. MIA hat daher vermutlich auf die frühe lymphogene Metastasierung von Melanomzellen im Grm1-Modell noch keinen Einfluss.

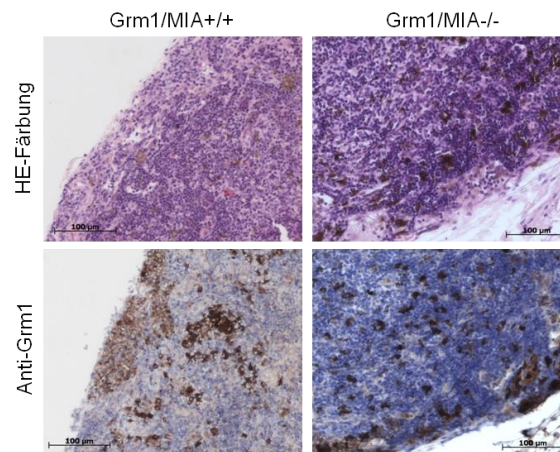


Abbildung 4-13: Immunhistochemische Färbung von Lymphknoten zur Analyse der lymphogenen Metastasierung. Sowohl bei Grm1/MIA+/+ als auch bei Grm1/MIA-/ - Tieren finden sich in der HE-Färbung zahlreiche pigmentierte Zellen. Die spezifische anti-Grm1 Färbung zeigt, dass ein Teil der metastasierten Tumorzellen unpigmentiert ist. In der Anzahl der disseminierten Melanomzellen zeigte sich insgesamt kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

Im Hinblick auf Fernmetastasierung neigt das humane Melanom vor allem zur Bildung von Metastasen in Lunge, Leber und ins Gehirn. Da beim Grm1-transgenen Mausmodell bislang keine Gehirnmastasen nachgewiesen werden konnten, wurden der Fokus auf die immunhistochemische Untersuchung von Lunge und Leber gelegt. Paraffinmaterial von Lungen und Lebern beider Versuchsgruppen wurde mittels anti-Grm1- und HE-Färbung immunhistochemisch ausgewertet. Grm1-positive disseminierte Melanomzellen wurden durch Auszählen analog 4.1.2 quantifiziert. Es zeigte sich, dass bei nahezu allen Lungenproben Grm1-positive Zellen nachweisbar waren. Der Vergleich zwischen HE- und anti-Grm1 Färbung zeigte, dass diese Zellen fast immer unpigmentiert sind. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wiesen Grm1/MIA-/ - Tiere jedoch eine signifikant geringere Anzahl an metastasierten Melanomzellen in der Lunge auf (Abbildung 4-14 A).

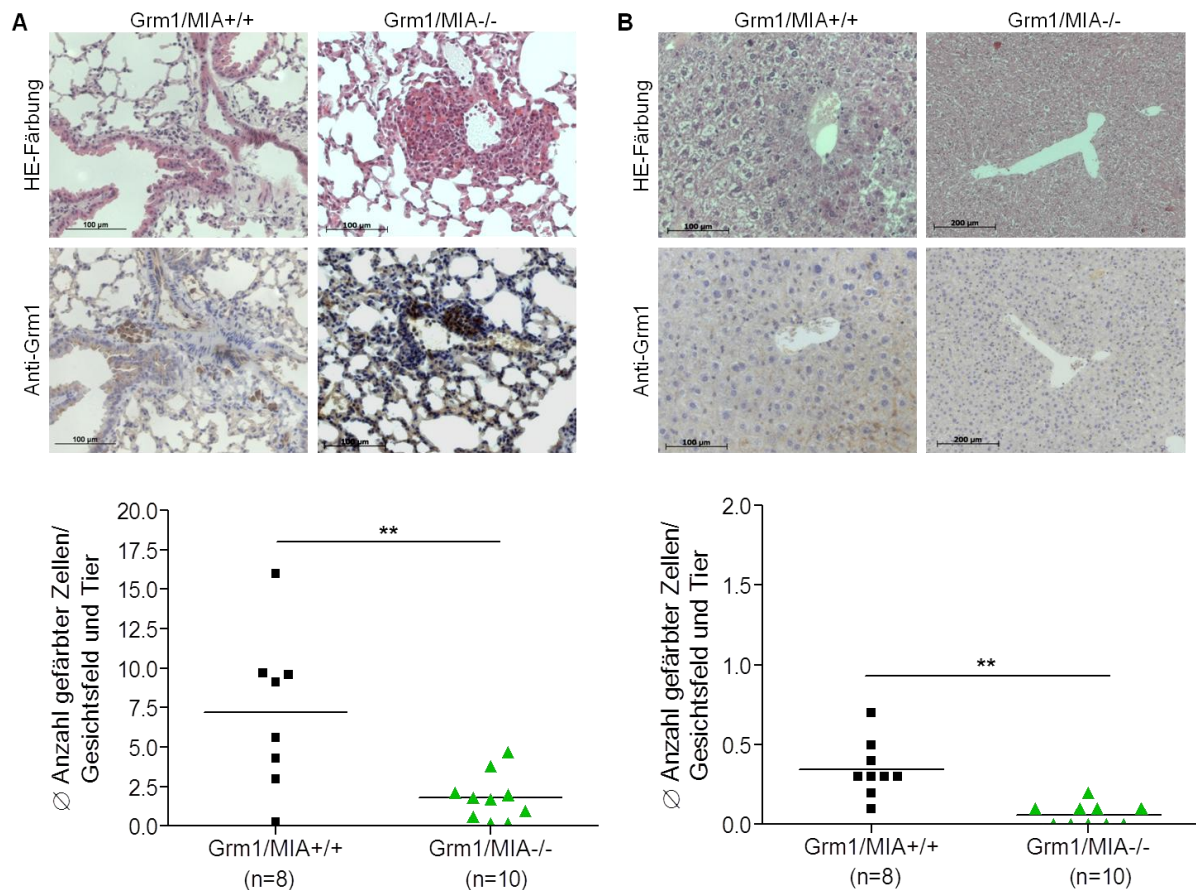


Abbildung 4-14: Untersuchung der Metastasierung von Melanomzellen in Lunge und Leber von Grm1/MIA+/+ und Grm1/MIA-/- Mäusen. Paraffinschnitte von Lungen und Lebern wurden mit einem anti-Grm1 Antikörper immunhistochemisch angefärbt und spezifisch gefärbte Zellen ausgezählt. Pro Schnitt wurden insgesamt 15 Gesichtsfelder ausgewertet und das Ergebnis auf die Anzahl disseminierter Tumorzellen pro Gesichtsfeld normalisiert. Zusätzlich wurde jeweils eine Hemalaun/Eosin-Färbung angefertigt. (A) In beiden Versuchsgruppen finden sich metastasierte Tumorzellen in der Lunge, jedoch weisen Grm1/MIA-/- Tiere eine signifikant geringere Anzahl von Grm1-positiven Zellen pro Gesichtsfeld auf. Die Mehrzahl dieser Zellen war unpigmentiert. (B) In den Lebern beider Versuchsgruppen finden sich insgesamt geringere Mengen an disseminierten Tumorzellen als in der Lunge. MIA-defiziente Melanommäuse weisen auch hier eine signifikant geringere Zahl von disseminierten Zellen pro Gesichtsfeld auf (** $P < 0,01$).

Diese betrug im Schnitt 0,2 bis maximal 4,7 Zellen pro Gesichtsfeld, während Grm1/MIA+/+ Tiere bis zu 16 Grm1-positive Zellen pro Gesichtsfeld aufwiesen. Die Auswertungen der Leberschnitte ergab ein ähnliches Ergebnis, allerdings wurden insgesamt deutlich weniger Grm1-positive Zellen als in den Lungen nachgewiesen. In beiden Gruppen ergab die Auszählung von 15 Gesichtsfeldern im Mittel weniger als eine Zelle pro Gesichtsfeld. Es wurden durchschnittlich also nicht in allen

untersuchten Geweberegionen metastasierte Zellen nachgewiesen. Insgesamt wies die MIA-defiziente Versuchsgruppe jedoch auch in der Leber eine signifikant geringere Anzahl an Grm1-gefärbten Zellen auf (Abbildung 4-14 B). Die Anzahl der metastasierten Melanomzellen in Lunge und Leber waren bei MIA-defizienten Tieren also insgesamt deutlich geringer. Diese Ergebnisse zeigten, dass MIA im Grm1-transgenen Mausmodell keinen Einfluss auf die lymphogene Metastasierung hat, fördert jedoch die Metastasierung von Melanomzellen in Lunge und Leber. Die bisherigen Erkenntnisse aus *in vitro* Versuchen unserer Arbeitsgruppe über die Rolle von MIA in der Melanomprogression konnten somit auch *in vivo* bestätigt werden.

4.2.3 Ursache des beschleunigten Melanomwachstums bei Grm/MIA-/- Mäusen

Während die Auswertung der Metastasenbildung unsere bisherigen Erkenntnisse aus *in vitro* Versuchen bestätigten (siehe 4.2.2.2), zeigten MIA-defiziente Grm1-transgene Mäuse entgegen unserer Erwartungen eine deutlich frühere Melanomentstehung im Vergleich zur Grm1/MIA+/+ Kontrollgruppe (siehe 4.2.2.1). Grm1/MIA-/- Tiere wiesen demzufolge ein verfrühtes Tumor-onset, später jedoch trotzdem deutlich weniger Metastasen in Lunge und Leber auf. Wir vermuteten deshalb, dass die Induktion von MIA in den Tumor-Vorstufen von Grm1/MIA+/+ Tieren zunächst zur Verzögerung des Tumorwachstums führt. Als Ursachen hierfür kommen zum Beispiel eine verminderte Proliferationsfähigkeit der Zellen in Frage, aber auch die Induktion von Apoptose. Letzteres konnte in früheren Versuchen bereits ausgeschlossen werden (Poser et al., 2004). Im Zusammenhang mit der Inhibition des frühen Tumorwachstums wurde der Mechanismus der Onkogen-induzierten Seneszenz (OIS) in benignen Nävi beschrieben (siehe 2.1.6.3). Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Expression von MIA in den frühen benignen Läsionen der Grm1/MIA+/+ Tiere zur Induktion von Onkogen-induzierter Seneszenz führte und dies in einer zeitweisen Verlangsamung der Grm1-vermittelten Hyperproliferation resultierte. In den MIA-defizienten Melanommäusen findet dieser Mechanismus nicht statt, wodurch es zur beschleunigten Progression kommt.

4.2.3.1 Korrelation zwischen MIA-Expression und Seneszenz in Melanozyten

Zunächst sollte am Gewebematerial der beiden Mausgruppen überprüft werden, ob in melanozytären Läsionen von Grm1/MIA+/+ Tieren höhere Seneszenzraten detektierbar sind als bei Grm1/MIA-/- Mäusen. Diese Versuche konnten bisher nicht erfolgreich etabliert und durchgeführt werden, da es *in vivo* nicht möglich war, den genauen Zeitpunkt der MIA-Induktion in den frühen Läsionen zu bestimmen (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden die weiteren Analysen in Zellkultur unter Verwendung von normalen Melanozyten und Melanomzellen durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde überprüft, ob sich humane Melanozyten in Zellkultur als Versuchssystem für die vorliegende Fragestellung eignen. Es ist bekannt, dass primäre Melanozyten in Zellkultur nach spätestens 12-15 Teilungen langsamer oder überhaupt nicht mehr wachsen, da sie in Seneszenz gehen (Bandyopadhyay, et al., 2001). Daher wurde zunächst untersucht, ob es dabei eine Korrelation mit der MIA-Expression gibt. Hierfür wurden NHEM in früher Passage (P1-P5) schrittweise bis in spätere Passagen (P6-P10) kultiviert und anschließend mittels qRT-PCR (3.2.1.5) auf die Expression von MIA analysiert. Im Laufe der Kultivierung zeigte sich dabei ein Anstieg der MIA-Expression über das Dreifache des Ausgangswertes Abbildung 4-15. Demnach kommt es bei Melanozyten in Zellkultur sukzessive zu einem Anstieg der MIA-Expression.

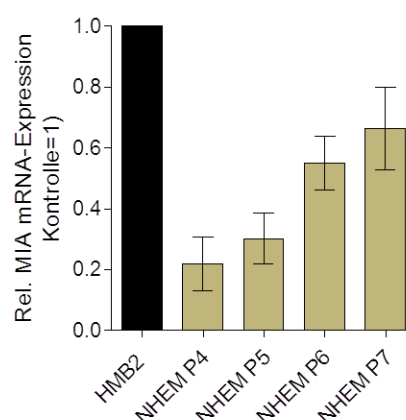


Abbildung 4-15: Analyse der MIA-Expression in normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM) verschiedener Passagen mittels qRT-PCR. Im Laufe der Passagierung steigt die MIA mRNA-Expression deutlich an. Die Melanomzelllinie HMB2 wurde als Positivkontrolle verwendet.

Es wurde daher im nächsten Schritt überprüft, ob zwischen der Induktion von MIA und dem vermehrten Auftreten von seneszenten Zellen bei kultivierten NHEM ein Zusammenhang besteht. Hierfür wurden wiederum Melanozyten in einer niedrigen und einer sehr hohen Passage auf die Expression von MIA untersucht. In der qRT-PCR Analyse zeigten NHEM in hoher Passage (P10) eine deutliche Induktion der MIA-Expression im Vergleich zur niedrigen Passage (P5) (Abbildung 4-16 A). Zum Nachweis von seneszenten Zellen wurde anschließend eine SA- β -Galaktosidase Färbung durchgeführt (3.2.3.5). Während NHEM in niedriger Passage (P5) noch keine seneszenten Zellen aufwiesen, waren bei NHEM in der hohen Passage (P10) zahlreiche seneszente Zellen detektierbar (Abbildung 4-16 B). Zur Quantifizierung wurden alle deutlich blau gefärbten Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt. NHEM in Passage 10 wiesen etwa 10 Mal mehr seneszente Zellen auf, als in Passage 5 (Abbildung 4-16 C). Dieses Ergebnis zeigte, dass die Expression von MIA in NHEM mit der Induktion von Seneszenz korreliert.

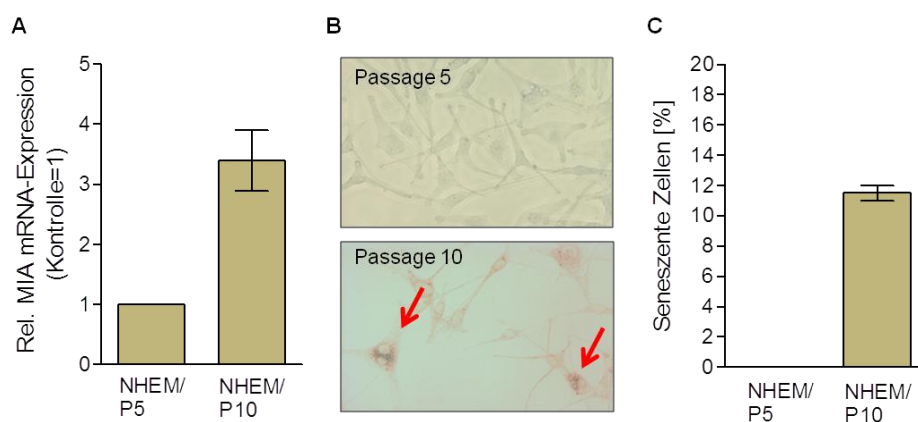


Abbildung 4-16: Zusammenhang zwischen der MIA-Expression in NHEM und dem Anteil seneszenten Zellen. (A) qRT-PCR Analyse der MIA mRNA-Expression. Im Vergleich zu Passage 5 (NHEM/P5) weisen Melanozyten in höherer Passage (NHEM/P10) eine mehr als dreifache Rate der MIA-Expression auf. (B) Vergleichende SA- β -Galaktosidase Färbung von Melanozyten in niedrigen Passage (P5) und in hoher Passage und (C) Quantifizierung der gefärbten Zellen. Während in der niedrigen Passage keine seneszenten Zellen nachweisbar sind, steigt die Anzahl in der hohen Passage deutlich an.

4.2.3.2 Der Einfluss von MIA auf die Seneszenz von Melanozyten

Da die MIA-Expression bei kultivierten Melanozyten mit einer Zunahme an seneszenten Zellen korreliert, vermuteten wir, dass MIA entweder direkt Seneszenz induziert oder als Vermittler daran beteiligt ist. Mittels spezifischer siRNAs (si-MIA) sollte die Expression von MIA in seneszenten Melanozyten herabreguliert und die Auswirkungen auf Seneszenz untersucht werden (3.2.3.4). Zunächst wurde die Effizienz der MIA-spezifischen siRNAs mittels qRT-PCR und MIA-ELISA (3.2.2.5.1) untersucht. Wie in Abbildung 4-17 gezeigt, konnte die MIA-Expression sowohl auf mRNA-Ebene (A) als auch auf Proteinebene (B) erfolgreich reduziert werden.

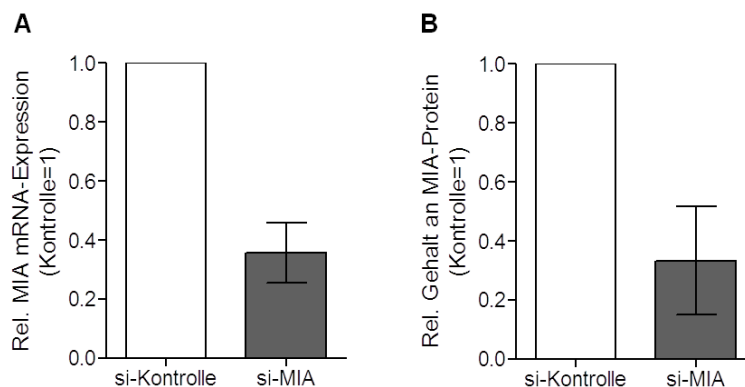


Abbildung 4-17: Nachweis und Erfolgskontrolle der siRNA-vermittelten Verringerung der MIA-Expression auf (A) mRNA-Ebene mittels qRT-PCR sowie auf (B) Proteinebene mittels ELISA. NHEM in höherer Passage wurden mit einer MIA-spezifischen siRNA (si-MIA) bzw. mit Kontroll-siRNAs (si-Kontrolle) behandelt. Die MIA mRNA-Expression konnte dabei auf durchschnittlich weniger als 40% im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen verringert werden. Die Menge an sezerniertem MIA-Protein in die Zellkulturüberstände konnte ebenfalls erfolgreich um mehr als 50% verringert werden.

Mittels SA- β -Galaktosidase Färbung wurde die Auswirkung der Herabregulation von MIA auf Seneszenz untersucht. Dabei konnte die Anzahl an seneszenten Zellen in si-MIA behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (si-Kontrolle) um 10% von etwa 28% auf ca. 18% signifikant reduziert werden (Abbildung 4-18 A). Durch die Verringerung von MIA in seneszenten Zellen nahm die Gesamtzahl der seneszenten Zellen somit ab. Seneszente Zellen zeichnen sich durch einen Proliferationsstopp aus. Mittels XTT-Proliferationsassay (3.2.3.6) wurde daher die Auswirkung der Herabregulation von MIA auf die Proliferationsrate untersucht. Wie in Abbildung 4-18

B gezeigt, wurde die Proliferation in si-MIA behandelten NHEM deutlich induziert. Die verringerte MIA-Expression führte demnach in NHEM in höherer Passage zu einer Steigerung der Proliferationsaktivität.

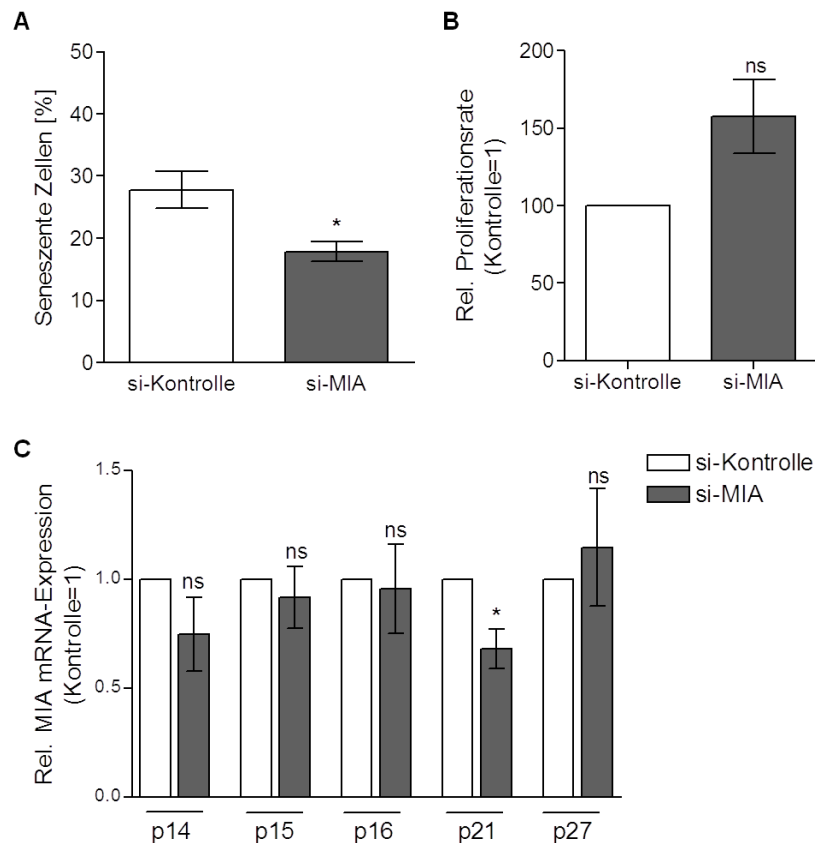


Abbildung 4-18: Der Einfluss von MIA auf Seneszenz in normalen humanen epidermalen Melanozyten. NHEM in höherer Passage wurden mit einer MIA-spezifischen siRNA (si-MIA) bzw. mit Kontroll-siRNAs (si-Kontrolle) behandelt und bei erfolgreicher Herabregulation von MIA auf Seneszenz untersucht. (A) SA- β -Galaktosidase Färbung zur Identifikation von seneszenten Zellen. Im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten NHEM wiesen Melanozyten mit verringerter MIA-Expression eine signifikant geringere Anzahl an seneszenten Zellen auf. (B) Gleichzeitig war die Proliferationsaktivität in si-MIA behandelten NHEM deutlich erhöht. (C) Die Analyse der Expression von Seneszenz-assoziierten Markermolekülen mittels qRT-PCR zeigte eine signifikant verringerte Expression von p21 in si-MIA behandelten NHEM. Die Expression von p14 war ebenfalls leicht verringert, bei p15, p16 und p27 zeigten sich keine eindeutigen Effekte. Die Ergebnisse entstanden aus drei unabhängigen Versuchsansätzen (ns, nicht signifikant; * $P < 0,05$).

Es wurden bis heute zahlreiche „klassische“ Seneszenzmarker beschrieben, deren Expression oder Aktivität zur Analyse von Seneszenz untersucht werden. Neben der Aktivität der SA- β -Galaktosidase zählen hierzu die Expression der Zellzyklus-

Inhibitoren p14 (ARF), p15 (INK4B), p16 (INK4A), p21 (CIP1) und p27 (KIP1) (2.1.6.3.1). Durch die Verringerung der MIA-Expression in NHEM in hoher Passage zeigte sich in qRT-PCR Analysen eine signifikant reduzierte Expression des Zellzyklus-Inhibitors p21 im Vergleich zu den Kontrollen. Die Expression von p14 war leicht reduziert, während die Expression von p15, p16 und p27 durch die Herabregulation von MIA nicht beeinflusst wurde (Abbildung 4-18 C). Die Verringerung der MIA-Expression in seneszenten Melanozyten führte demnach zur Herabregulation von Zellzyklus-Inhibitoren und zu einer Steigerung der Proliferationsaktivität, gleichzeitig sinkt der Anteil an seneszenten Zellen.

4.2.4 MIA und Seneszenz in Melanomzellen

Die durchgeführten Analysen zeigen deutlich, dass MIA bei Melanozyten in den Mechanismus der Seneszenz involviert ist. Da unsere Melanomzelllinien hohe MIA-Mengen exprimieren und sezernieren, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob MIA auch in Melanomzellen einen Einfluss auf Seneszenz hat. In unserer Arbeitsgruppe ist das MIA-defiziente HMB2-MIA5 Zellsystem etabliert. Diese wurden mittels stabiler Transfektion eines *antisense*-MIA cDNA-Konstruktes in die Melanomzelllinie HMB2 generiert. Die MIA-defizienten Klone zeigten die Wiederaufnahme eines melanozytären Phänotyps. Auffallend war, dass diese Klone sich morphologisch deutlich von der ursprünglichen HMB2 Zelllinie unterschieden und zudem wesentlich kleiner waren. HMB2 Zellen enthielten außerdem einen Anteil an vielkernigen Zellen, die in den MIA-negativen HMB2-MIA5 Zellen nicht mehr vorzufinden waren (Poser, et al., 2004; Tatzel, et al., 2005). Vielkernigkeit und eine ausgebreitete Zellmorphologie können Kennzeichen von seneszenten Zellen sein. Um dies zu überprüfen, wurden HMB2 Melanomzellen und die MIA-defizienten HMB2-MIA5 Klone auf die Aktivität von SA- β -Galaktosidase untersucht. Dabei waren in der HMB2-Linie zahlreiche Zellen tiefblau gefärbt und wiesen somit eine hohe Aktivität an SA- β -Galaktosidase auf (Abbildung 4-19). Je nach Zustand der Zellen betrug dieser Anteil bis über ein Drittel der Gesamtzellzahl. Dieses Ergebnis war für eine Melanomzelllinie überraschend. Im Gegensatz hierzu konnten in den MIA-defizienten Zellklonen keine blau gefärbten Zellen detektiert werden. Durch das Fehlen von MIA in der HMB2-MIA5 Linie wurde offenbar die Induktion von Seneszenz unterbunden.

Es wurden im Folgenden weitere Melanomzelllinien auf eine erhöhte SA- β -Galaktosidase Aktivität untersucht. Dabei zeigten SK-MEL-28 Melanomzellen einen ähnlich hohen Anteil an positiven Zellen, alle weiteren getesteten Zelllinien waren negativ (Daten nicht gezeigt). Somit spielt Seneszenz vermutlich auch in Tumorzellen eine Rolle, die jedoch vermutlich durch noch unbekannte Mechanismen umgangen werden kann.

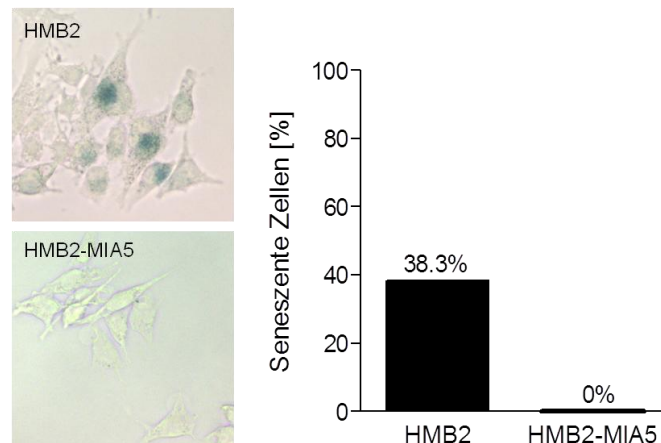


Abbildung 4-19: SA- β -Galaktosidase Färbung zum Nachweis von Seneszenz in HMB2 und HMB2-MIA5 Melanomzelllinien. In der Melanomzelllinie HMB2 finden sich zahlreiche seneszente Zellen, die in den MIA-defizienten Zellklonen HMB2-MIA5 nicht mehr nachweisbar sind.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass MIA in der frühen Melanomentstehung von Grm1-Tieren eine wichtige Rolle spielt, da Grm1/MIA^{-/-} Melanommäuse ein signifikant früheres malignes Tumorwachstum aufwiesen. Erste Analysen an humanen Melanozyten wiesen darauf hin, dass MIA am Mechanismus der Onkogen-induzierten Seneszenz beteiligt ist dadurch das Tumorwachstum in Grm1/MIA^{+/+} Mäusen zunächst verzögert wird. Die zugrundeliegenden Mechanismen sowie die Frage, wie Seneszenz schließlich in den meisten malignen Zellen umgangen werden kann, sind Gegenstand zukünftiger Experimente.

4.3 *In vivo* Untersuchung zur Rolle von BMP6 in der Melanomentstehung und -progression

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle des Proteins BMP6 in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms unter Verwendung des Grm1-transgenen Mausmodells untersucht. Durch *in vitro* Analysen konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass die BMPs 2, 4 und 7 im malignen Melanom stark exprimiert vorliegen und die Tumorprogression fördern (siehe 2.3.3) (Rothhammer, et al., 2005). Da BMP6 bereits mit anderen Tumorarten in Verbindung gebracht wurde, vermuteten wir, dass auch BMP6 auch im malignen Melanom eine Rolle spielt. Hierfür wurde zum einen die BMP6-Expression im malignen Melanom genauer analysiert. Die Relevanz von BMP6 in der Melanomentstehung und -progression *in vivo* wurde anhand einer BMP6-defizienten Grm1-Melanommauslinie untersucht. Die unter 4.3.1 dargestellten Daten zur Expression von BMP6 in Melanomzelllinien und -geweben sowie die Untersuchungen unter 4.3.4 entstanden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Simone Braig (vorher: Molekulare Pathologe, Universitätsklinikum Regensburg; jetzt: Fakultät für Chemie und Pharmazie, LMU München).

4.3.1 Expression von BMP6 im malignen Melanom

Zunächst wurde die Expression von BMP6 im malignen Melanom auf mRNA- und Proteinebene analysiert. In qRT-PCR Analysen zeigten dabei alle untersuchten Melanomzelllinien eine deutlich verstärkte BMP6 mRNA-Expression im Vergleich zu normalen Melanozyten (NHEM) (Abbildung 4-20 A). Mittels ELISA-Technik (3.2.2.5.2) wurde die BMP6-Proteinmenge in Melanomzelllinien im Vergleich zu NHEM bestimmt. Alle untersuchten Melanomzellen wiesen dabei einen hohen BMP6-Proteingehalt auf. Die gemessene BMP6-Proteinmenge in NHEM war dagegen sehr niedrig (Abbildung 4-20 B). Auffallend war hierbei, dass die BMP6-Expressionstärken auf Proteinebene teilweise nicht mit den mRNA-Daten übereinstimmten. Insgesamt zeigten Melanomzellen jedoch eine deutliche BMP6-Überexpression im Vergleich zu NHEM. Um diese Ergebnisse *in situ* zu bestätigen, wurden humane Melanom-Gewebeproben auf die Expression von BMP6 mittels qRT-PCR (3.2.1.5) analysiert.

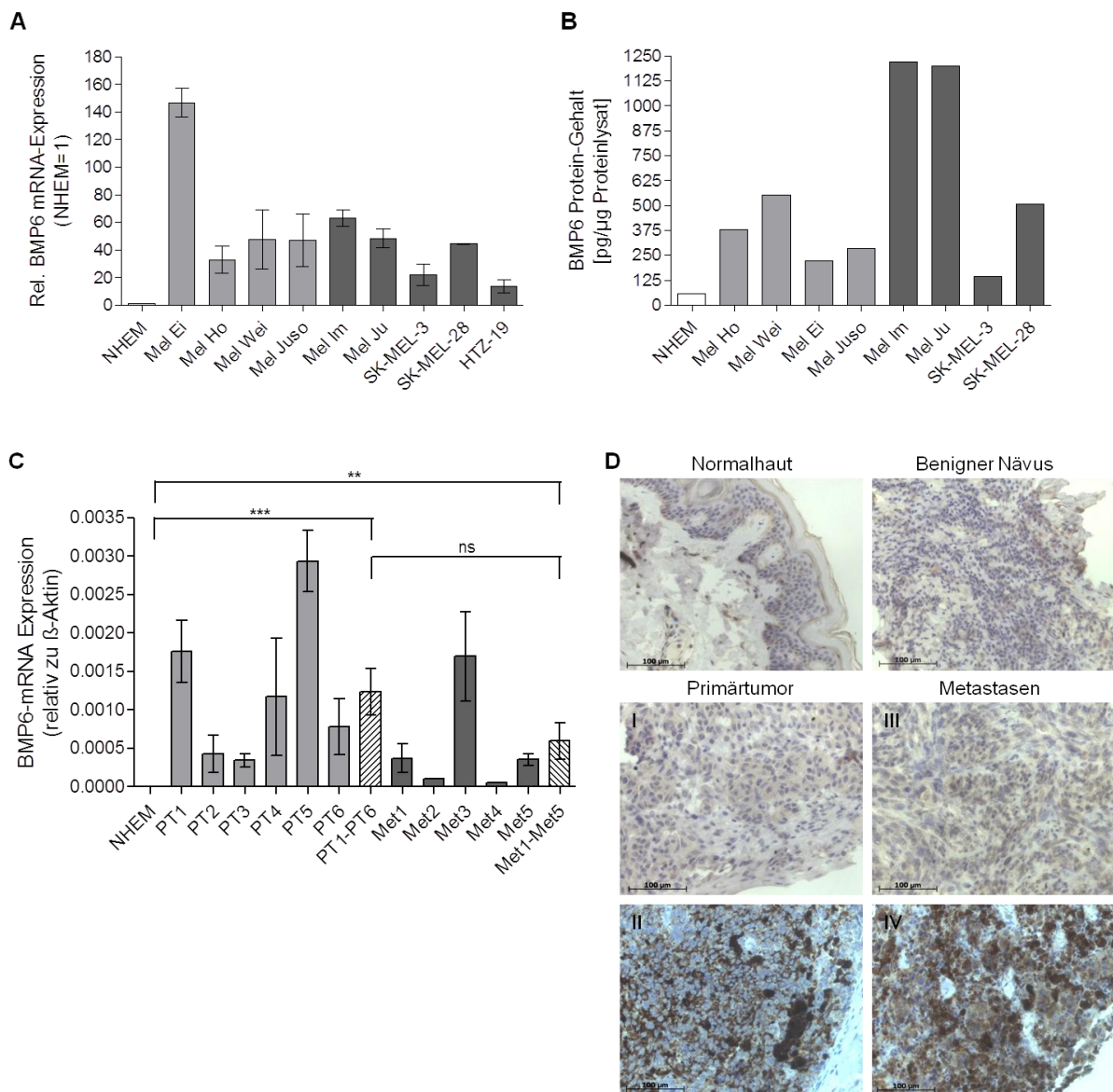


Abbildung 4-20: BMP6-Expressionanalysen an Melanomzelllinien, humanen Melanomgeweben, Nävi und Normalhaut. Aus Primärtumoren stammende Zelllinien wurden hellgrau hinterlegt, dunkelgrau markierte Zelllinien stammen ursprünglich aus Melanom-Metastasen. (A) In qRT-PCR Analysen wiesen Melanomzelllinien im Vergleich zu normalen humanen Melanozyten (NHEM) eine deutlich verstärkte BMP6 mRNA-Expression auf. (B) In allen untersuchten Melanomzelllinien wurden im ELISA hohe BMP6 Proteinmengen im Vergleich zu NHEM detektiert. (C) Melanom-Gewebeproben zeigten eine starke BMP6 mRNA-Expression im Vergleich zu NHEM. Insgesamt wiesen die Melanommetastasen (Met1-Met5) eine leicht geringere BMP6-Expression als die Primärtumore (PT1-PT6) auf. (D) In der immunhistochemischen anti-BMP6 Färbung zeigte sich ein heterogenes Expressionsmuster innerhalb der Primärtumoren und Metastasen. In beiden Fällen fanden sich sowohl negative (I), schwach positive (III) als auch stark positive Tumoren (II, IV). Im Vergleich hierzu wurde in normaler Haut und in benignen Nävi keine BMP6-Expression detektiert (ns, nicht signifikant, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Dabei wiesen sowohl primäre Melanome (PT1-PT6) als auch Melanommetastasen (Met1-Met5) eine starke BMP6 mRNA-Expression im Vergleich zu NHEM auf (Abbildung 4-20 C). Die Expressionsstärke war in den Primärtumoren etwas höher als in den Melanommetastasen. Insgesamt zeigten sich die für Gewebeproben typischen Schwankungen. Mittels immunhistochemischen Färbungen wurde die BMP6 Proteinexpression in humanen Melanomgeweben anhand eines „Multi-tissue-Arrays“ auf einem Objektträger analysiert (3.2.2.6.2). Dieser enthielt ausgestanzte Gewebeproben von normaler Haut, benignen Nävi sowie von Melanomgewebe aus Primärtumoren und Metastasen. In normaler Haut sowie in benignen Nävusproben fand sich keine BMP6 Proteinexpression (Abbildung 4-20 D: Normalhaut, Benigner Nävus). Die Auswertung der BMP6-Expression in Primärtumoren und Metastasen ergab ein heterogenes Expressionsmuster. 55% der untersuchten Primärtumoren zeigten eine starke BMP6-Proteinexpression, 17% eine leichte Färbung und 33% keine BMP6 Proteinexpression (Abbildung 4-20 D: I, II). Bei den untersuchten Melanommetastasen waren nur 31% stark positiv, während hier 23% eine leichte BMP6 Proteinexpression aufwiesen und der größere Anteil mit 46% negativ einzuordnen war (Abbildung 4-20 D III, IV). Bei den Geweben wiesen somit die Melanommetastasen insgesamt eine leicht geringere BMP6 Expression als die Primärtumore auf.

4.3.2 Züchtung einer BMP6-defizienten Grm1-transgenen Mauslinie

Die Expressionsanalysen in Melanomzelllinien und Melanomgeweben wiesen darauf hin, dass BMP6 in die Pathogenese des malignen Melanoms involviert sein könnte. Um die Rolle des Moleküls in der frühen Melanomentstehung und in der Tumorprogression zu analysieren, wurden *in vivo* Untersuchungen an BMP6-defizienten Melanommäusen durchgeführt. Im ersten Schritt wurde hierfür eine BMP6-defiziente Grm1-Melanommauslinie durch Kreuzung generiert. Die BMP6-defiziente Mauslinie wurde bereits in unserem Labor gezüchtet (3.1.5.2.2). Methodisch wurde bei der Kreuzung analog wie bei der unter 4.2.1 beschriebenen Züchtung der MIA-defizienten Grm1-Mauslinie verfahren. Aus Zuchtgründen wurden die Grm1/BMP6-/- Tiere auf unpigmentiertem Albino-Hintergrund generiert. Dabei entstand parallel eine Albino-Grm1/BMP6+/+ Kontrolllinie. Zur Überprüfung der Eignung für die vorliegende

Fragestellung erfolgte zunächst eine nähere Charakterisierung der entstandenen Mauslinien. Dabei zeigte sich, dass sowohl Grm1/BMP6^{+/+} als auch Grm1/BMP6^{-/-} Tiere vor allem an Ohren und Schwanz deutliche Melanome entwickelten und die inguinalen Lymphknoten häufig vergrößert waren. In der HE-Färbung (3.2.2.6.1) waren die Tumore sowie die darin enthaltene große Anzahl einzelner Tumorzellen deutlich erkennbar (Abbildung 4-21 A).

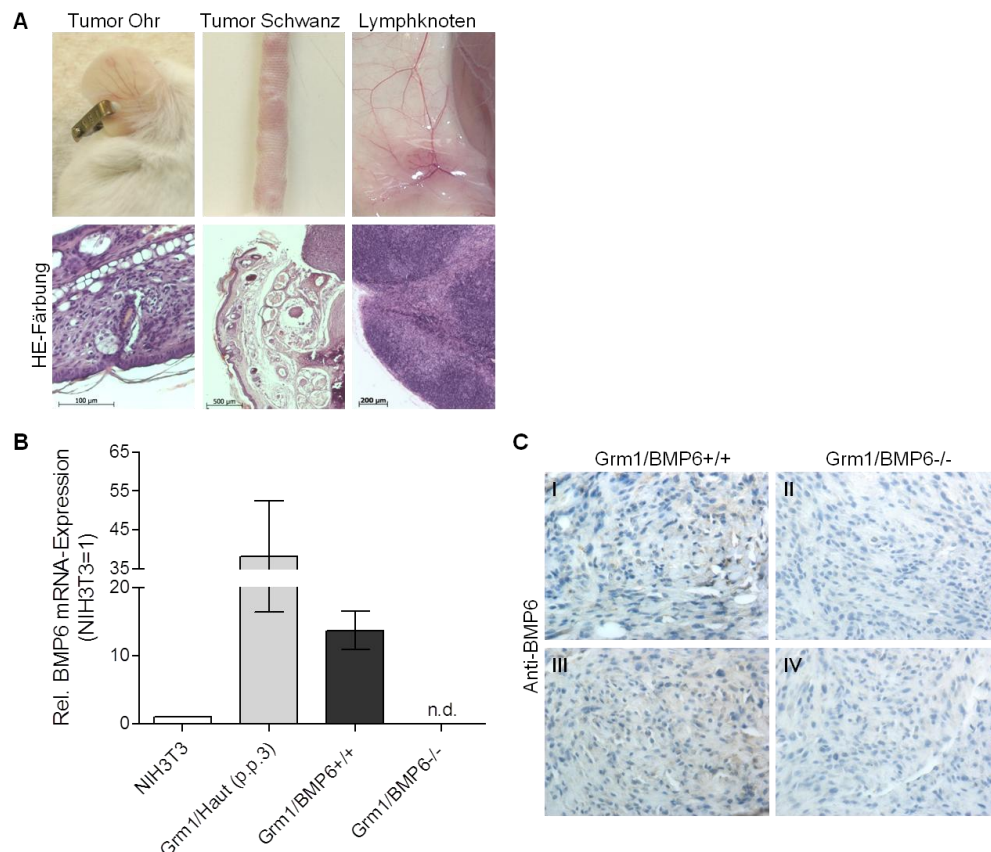


Abbildung 4-21: Analyse des Tumorwachstums bei der Herstellung von Grm1/BMP6^{+/+} und BMP6-defizienten Grm1-transgenen Tieren. (A) In beiden Mauslinien zeigten sich vor allem an den Ohren und am Schwanz deutliche teils abgegrenzte Melanome. Die näheren Lymphknoten an den Leisten waren meist leicht oder deutlich vergrößert. In der HE-Färbung war eine nestartige Anhäufung von Melanomzellen erkennbar. (B) BMP6-Expressionsanalyse in Tumoren mittels qRT-PCR. Aus Grm1/BMP6^{+/+} Mäusen stammende Tumore zeigen eine deutliche BMP6 mRNA-Expression. In Tumoren aus BMP6-defizienten Tieren war keine BMP6-Expression nachweisbar. NIH3T3 Zellen wiesen eine sehr niedrige BMP6-Expression auf, Hautproben von 3 Tage alten Grm1/BMP6^{+/+} Tieren dienten als Positivkontrolle. (C) Immunhistochemische Analyse der BMP6 Protein-Expression in primären Melanomen. Tumore aus Grm1/BMP6^{+/+} Tieren zeigten eine deutliche BMP6-Färbung (I, III), während diese in Melanomproben aus Grm1/BMP6^{-/-} Mäusen nicht detektierbar waren (II, IV) (p.p. *post partum*; n.d., nicht detektiert).

Von beiden Mauslinien wurden anschließend Tumorproben auf die Expression von BMP6 untersucht. In qRT-PCR Analysen wiesen Tumore aus Grm1/BMP6+/+ Tieren eine hohe BMP6 mRNA-Expression auf, während diese in Grm1/BMP6-/- Tumoren nicht detektierbar war. Die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 wurde dabei als Negativkontrolle, die Haut von neugeborenen Grm1-Tieren als Positivkontrolle eingesetzt (Abbildung 4-21 B). Der Nachweis von BMP6-Protein in den Tumorproben erfolgte mittels immunhistochemischen Färbungen von Paraffinmaterial. Dabei konnte in Tumoren von Grm1/BMP6+/+ Mäusen eine klare BMP6-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 4-21 B). In Tumorproben aus BMP6-defizienten Grm1-transgenen Tieren erfolgte keine spezifische Färbung (Abbildung 4-21 C: II, IV). Diese Untersuchungen bestätigten, dass BMP6 in den Tumoren des Grm1-transgenen Melanom-Mausmodells exprimiert wird. Das Mausmodell war somit für die Fragestellung und die folgenden Untersuchungen geeignet. Es erfolgte die Züchtung der beiden Versuchsgruppen mit einer minimalen Anzahl von je 12 Tieren.

4.3.3 Der Einfluss von BMP6 auf die Tumorentstehung und Progression im Mausmodell

Um die Relevanz von BMP6 in der Melanomentstehung aufzuklären, erfolgte eine vergleichende Analyse des Melanomwachstums bei Grm1/BMP6+/+ und Grm1/BMP6-/- Tieren. Nach Tumor-*onset* wurden die Tiere für weitere 60 Tage beobachtet und alle Veränderungen im Melanomwachstum anhand des beschriebenen Klassifikationssystems (4.1.1) dokumentiert. Zudem wurde anhand dieser Daten die Stärke der Tumorprogression bestimmt. Für weitere Untersuchungen erfolgte anschließend die Asservierung von Gewebeproben (3.2.4.4).

4.3.3.1 Vergleichende Dokumentation des Tumorwachstums in vivo

Zur Bestimmung des Melanom-*onsets* wurde jedes Tier individuell wöchentlich auf Tumorwachstum an Ohren, Schwanz und Perianalregion analog 4.2.2 untersucht. Die Tiere der Grm1/BMP6+/+ Kontrollgruppe wiesen dabei mit durchschnittlich 111,2 Tagen zum ersten Mal Melanome auf. Verglichen mit der Grm1-Kontrollgruppe auf

C57Bl/6 Hintergrund aus Versuch 4.2.2.1 ist dieser Wert deutlich niedriger. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass der Übergang vom Nävus zum Melanom bei der fehlenden Pigmentierung der Grm1/BMP6+/+ Tiere mit größerer Genauigkeit bestimmt werden konnte. Da beide Versuchsgruppen auf Albino-Hintergrund gezüchtet wurden, konnte dieser Unterschied innerhalb des Versuchsansatzes vernachlässigt werden. Im Vergleich zur Grm1/BMP6+/+ Kontrollgruppe war der Beginn des Melanomwachstums bei den BMP6-defizienten Grm1-transgenen Tieren mit einem Durchschnitt von 171,1 Tagen stark verzögert (Abbildung 4-22 A). Das Melanom-onset trat in dieser Versuchsgruppe somit mehr als acht Wochen später als bei den Grm1/BMP6+/+ Kontrolltieren auf. Bei der Analyse der Tumorprogression zeigte sich, dass das Tumorstadium bei Grm1/BMP6+/+ Tieren innerhalb der 60 Tage nach Tumor-onset im Mittel von Stufe 1 bis über Stufe 2 anstieg, während Grm1/BMP6-/- Tiere einen deutlich langsameren Progress aufwiesen. Hier wurde im Durchschnitt nur ein Wert knapp über Level 1 erreicht (Abbildung 4-22 B). Dies bedeutet, dass das Tumorstadium in Grm1/BMP6-/- Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verlangsamt ist.

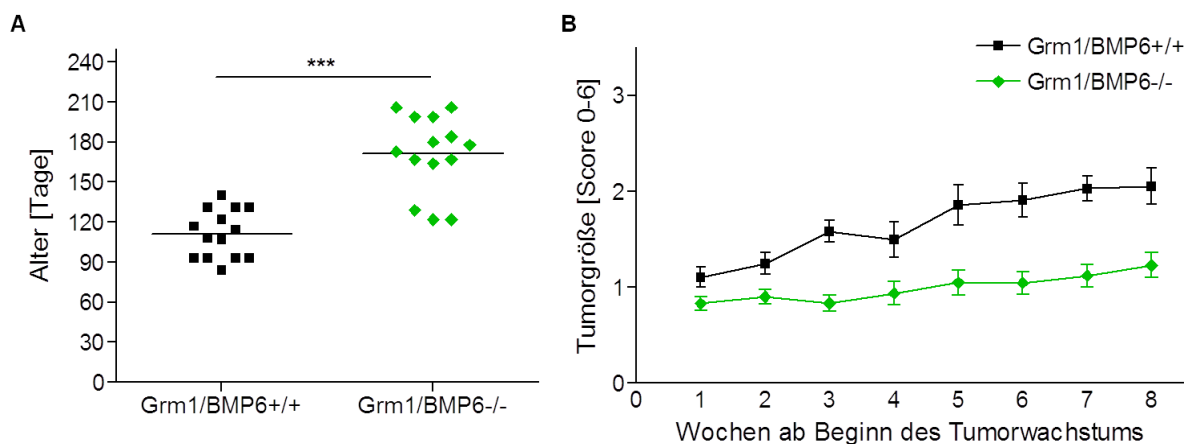


Abbildung 4-22: Analyse von Tumor-onset und Dokumentation des weiteren Verlaufes bis 9 Wochen nach Einsetzen des Melanomwachstums. (A) Im Vergleich zu Grm1/BMP6+/+ Tieren wiesen BMP6-defiziente Grm1-Tiere einen signifikant späteren Beginn des Melanomwachstums auf. Die Dokumentation erfolgte an Schwanz, Ohren und Perianalregion und wurde in Tagen angegeben. Beginnend mit dem Einsetzen des Melanomwachstums wurde die Tumorstadiumprogression für weitere 9 Wochen dokumentiert. Das weitere Tumorstadiumwachstum war bei den BMP6-defizienten Tieren mit einem Score von maximal 1 im Vergleich zur Grm1/BMP6+/+ Kontrollgruppe deutlich verlangsamt. Der Zeitpunkt „0“ entspricht jeweils dem mittleren Tumor-onset aus Grafik (A) (***) ($P < 0,001$).

Diese Daten zeigen, dass BMP6 eine wichtige Rolle in der frühen Melanomentstehung bei der Grm1-transgenen Maus spielt. In den folgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob BMP6 auch einen Einfluss auf das Metastasierungsverhalten hat.

4.3.3.2 Der Einfluss von BMP6 auf die Metastasierung von Melanomzellen

Für das Grm1-transgene Mausmodell wurde beschrieben, dass es häufig zur Metastasierung in die näheren Lymphknoten kommt. Zunächst wurde deshalb der Einfluss von BMP6 auf die lymphogene Metastasierung von Melanomzellen untersucht. Hierfür wurden die inguinalen Lymphknoten sowie die Milz aus Grm1/BMP6+/+ und Grm1/BMP6-/- Mäusen immunhistochemisch auf die Expression des Grm1-Rezeptors untersucht (3.2.2.6.2). In beiden Versuchsgruppen wurden dabei sowohl in den Lymphknoten als auch in der Milz Grm1-positive Zellen detektiert. Dabei konnte insgesamt kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Repräsentative HE- und Grm1-Färbungen am Beispiel der Milz sind in Abbildung 4-23 dargestellt.

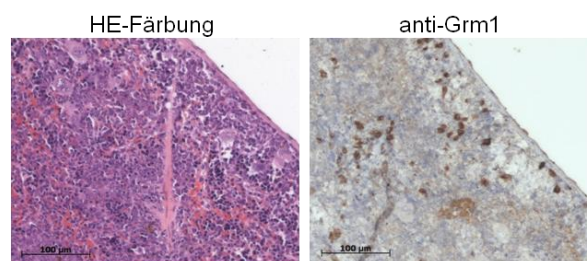


Abbildung 4-23: Analyse der Metastasierung in die Milz mittels HE-Färbung und einer spezifischen anti-Grm1 Färbung. In beiden Versuchsgruppen wurden Grm1-positive Zellen innerhalb der Milz detektiert. In der Anzahl der Melanomzellen konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Im Folgenden wurde das Metastasierungsverhalten in ferne Organe vergleichend untersucht. Der Nachweis von disseminierten Tumorzellen erfolgte analog 4.2.2.2 mittels anti-Grm1- und HE-Färbung und der Auszählung von 15 Gesichtsfeldern pro Gewebe und Tier. In den Lungen beider Versuchsgruppen wurden dabei metastasierte Melanomzellen detektiert. In der Quantifizierung zeigte sich, dass in den Lungen der Kontrolltiere zwischen 0 und durchschnittlich 13,8 Grm1-positive

Zellen pro Gesichtsfeld auftraten. In den Lungen der Grm1/BMP6^{-/-} Gruppe wurden im Mittel 0 bis maximal 4,5 positive Zellen pro Gesichtsfeld detektiert. Im Durchschnitt ergab sich zwischen den Versuchsgruppen jedoch kein signifikanter Unterschied (Abbildung 4-24 A).

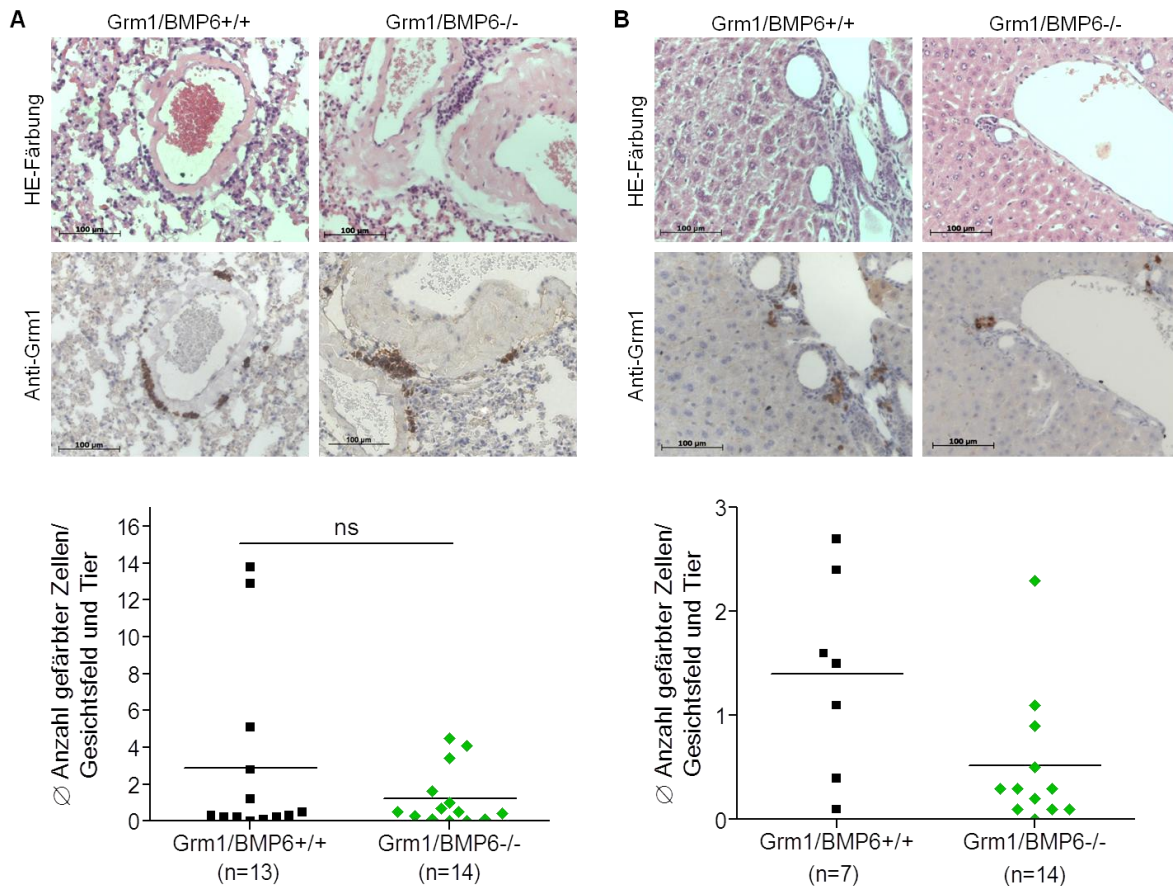


Abbildung 4-24: Nachweis und Quantifizierung der Metastasierung in Lunge und Leber. (A) Anhand der HE- und der Grm1-spezifischen Färbung wurden metastasierte Melanomzellen in den Lungen von Grm1/BMP6^{+/+} und Grm1/BMP6^{-/-} Tieren nachgewiesen. Die Auszählung gefärbter Zellen ergab keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl disseminierter Tumorzellen. (B) Die Metastasierung in die Leber wurde analog zu den Lungen ausgewertet. In beiden Versuchsgruppen fanden sich einzelne Melanomzellen in der Leber. Die Quantifizierung konnte bei den Grm1/BMP6^{+/+} Tieren aufgrund eines bisher ungeklärten Phänotyps nicht komplett ausgewertet werden (ns, nicht signifikant).

Analog zur Lunge erfolgte der Nachweis von metastasierten Tumorzellen in die Leber. Mittels anti-Grm1 Färbung konnte wiederum in beiden Versuchsgruppen spezifisch gefärbte Zellen detektiert werden. Insgesamt handelte es sich dabei um

eine deutlich geringere Anzahl als in den Lungen. Bei Grm1/BMP6^{+/+} Mäusen wurden im Mittel zwischen 0,1 und 2,7 Zellen pro Gesichtsfeld gefunden, die durchschnittliche Anzahl positiver Zellen in der Grm1/BMP6^{-/-} Gruppe betrug zwischen 0 und 2,3 Zellen (Abbildung 4-24 B). Wie in der HE-Färbung deutlich erkennbar ist, wiesen die Lebern der Grm1/BMP6^{+/+} Kontrollgruppe jedoch massive Anomalitäten auf. Die histologische Beurteilung wies auf massive Entzündungen oder eine Fehlentwicklung der Gallengänge hin, die genauen Umstände konnte jedoch nicht geklärt werden. Aufgrund dieser Befunde konnten einige Lebern nicht in die unter Abbildung 4-24 B gezeigte Quantifizierung einbezogen werden. Daher konnte hier kein aussagekräftiges Ergebnis erstellt werden. Insgesamt zeigen diese Daten, dass BMP6 im Grm1-transgenen Mausmodell weder auf die lymphogene noch auf die Fernmetastasierung von Melanomzellen einen Einfluss hat.

4.3.4 Die Wirkung von BMP6 in der Melanomentstehung

Es konnte gezeigt werden, dass BMP6 in der Melanomentwicklung des Grm1-transgenen Melanommodells eine bedeutende Rolle spielt, da BMP6-defiziente Grm1-Tiere ein signifikant verzögertes Einsetzen des Melanomwachstums aufwiesen (4.3.3.1). Bei der Metastasierung in Lymphknoten, Milz, Lunge und Leber wurde kein eindeutiger Unterschied gefunden (4.3.3.2). Wir vermuteten daher, dass BMP6 ausschließlich in der frühen Melanomentwicklung eine Rolle spielt und auf das Fortschreiten der Erkrankung keinen Einfluss mehr hat. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden von Frau Dr. Simone Braig bereits Vorarbeiten zum Einfluss von BMP6 auf humane Melanomzellen und Melanozyten durchgeführt. In den funktionellen Analysen konnte dabei kein Effekt von BMP6 auf das Proliferationsverhalten, die Migration und das Matrix-unabhängige Wachstum von Melanomzellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurden daher die Auswirkungen von BMP6 auf normale Melanozyten untersucht. Hierfür wurden NHEM mit 0, 10 ng/mL oder 100 ng/mL rekombinantem humanem BMP6-Protein (rhBMP6) für 6h, 24h und 48h behandelt. Da aus Studien an Mäusen bereits bekannt ist, dass BMP6 in Entwicklungsprozesse der Epidermis von neugeborenen Mäusen involviert ist, wurden im Versuch die Auswirkungen der BMP6-Behandlung auf den Differenzierungsstatus von NHEM untersucht. Dabei

zeigten BMP6-behandelte Melanozyten Änderungen im Expressionsmuster von Differenzierungs-assoziierten bzw. Melanom-assoziierten Faktoren. Nach BMP6-Behandlung war die Expression von SNAIL1 signifikant erhöht, SLUG wurde durch die Behandlung ebenfalls leicht induziert. Gleichzeitig wurde die Expression von E-Cadherin signifikant reduziert, die Expression von TRP2 wurde ebenfalls leicht verringert (Abbildung 4-25 A). Die Analyse von Stammzell-assoziierten Faktoren wie SOX2, PAX3, und NANOG zeigten keine Regulation (Daten nicht gezeigt). BMP6 wirkt somit hemmend auf die Differenzierung von melanozytären Zellen bzw. fördert deren Dedifferenzierung. In unserem Labor wird die Methode der Dedifferenzierung von Melanoblasten-ähnlichen Zellen (MBrc) aus Melanozyten durchgeführt (Bosserhoff, et al., 2011). Mittels qRT-PCR Analysen wurde in MBrcs die Expression von BMP6 im Vergleich zu den ursprünglichen Melanozyten untersucht (die RNA-Proben wurden von Frau Dr. Silke Kuphal (Molekulare Pathologie, Uniklinikum Regensburg) zur Verfügung gestellt). Es zeigte sich, dass BMP6 im dedifferenzierten Status signifikant verstärkt exprimiert vorliegt (Abbildung 4-25 B).

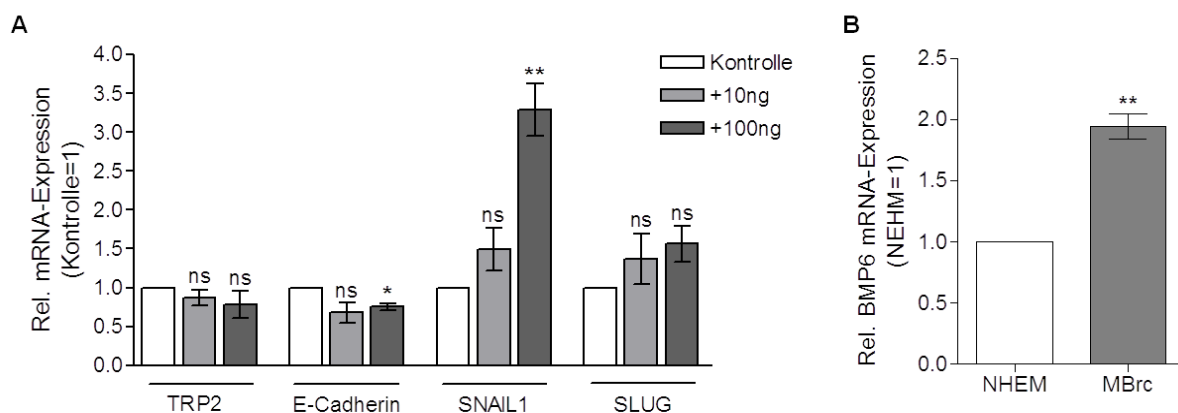


Abbildung 4-25: Auswirkungen von BMP6 auf die Differenzierung von Melanozyten. (A) Primäre Melanozyten wurden für 6h, 24h und für 48h mit 10 ng/mL oder 100 ng/mL behandelt und anschließend mittels qRT-PCR auf Änderungen in der Differenzierung untersucht. Während die Expression von TRP2 nur gering beeinflusst wurde, wurde E-Cadherin signifikant reduziert. Die mRNA-Expression von SLUG wurde leicht induziert, die mRNA-Expression von SNAIL1 wurde durch BMP6 signifikant erhöht. (B) qRT-PCR Analyse der BMP6 mRNA-Expression in Melanoblasten-ähnlichen Zellen (MBrc) im Vergleich zu den korrespondierenden Melanozyten. Dedifferenzierte MBrcs wiesen eine etwa zweifach höhere BMP6-Expression auf als die zugehörigen NHEM (ns, nicht signifikant; * $P < 0,05$).

Insgesamt konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass BMP6 im malignen Melanom zumeist verstärkt exprimiert vorliegt und an der Entstehung von Melanomen *in vivo* maßgeblich beteiligt ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BMP6 in der fortgeschrittenen Erkrankung keinen Einfluss mehr auf die Metastasierung hat. Erste Daten gaben Hinweise darauf, dass BMP6 über die Regulation des Differenzierungsstatus an der frühen Melanomentstehung beteiligt ist. Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen werden Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

4.4 Der Einfluss von Verfettung auf die Entstehung und Progression des malignen Melanoms

Im vierten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle von erhöhter Verfettung in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms unter Verwendung des Grm1-Melanommodells untersucht. Es ist bereits für zahlreiche bösartige Erkrankungen bekannt, dass ein erhöhter Körperfettanteil und Übergewicht die Entstehung von Tumoren fördern. Aus epidemiologischen Studien gibt es Hinweise, dass dies auch auf das maligne Melanom zutrifft (siehe 2.4). Bis heute existieren zu dieser interessanten Fragestellung jedoch noch keine aussagekräftigen *in vivo* Untersuchungen. Da sich das Grm1-transgene Mausmodell durch eine spontane Melanomentstehung mit 100% Penetranz in einer relativ kurzen Zeitspanne auszeichnet, war dieses besonders gut für diese Fragestellung geeignet.

4.4.1 Auswirkungen der Paigen-Diät beim Grm1-Mausmodell

Grm1-transgene Mäuse wurden in zwei Gruppen aufgeteilt und beginnend mit einem Alter von 28 Tagen entweder mit dem Standard-Pelletfutter oder mit der sogenannten Paigen-Diät bis zur Beendigung der Studie ernährt (siehe 3.2.4.3). Es wurde gezeigt, dass die Paigen-Diät bei Nagern zur einer massiven Verfettung der Leber und zur Ausbildung einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis führt (Matsuzawa, et al., 2007). Wie in Abbildung 4-26 A anhand repräsentativer Beispiele gezeigt ist, war dies auch beim Grm1-Mausmodell der Fall. Die Lebern von Tieren unter Standardernährung (Grm1/Normalfutter) wiesen makroskopisch ein normales

Aussehen mit gesunder rötlich-brauner Farbe und weicher Konsistenz auf. In der HE-Färbung (3.2.2.6.1) waren keine zellulären Auffälligkeiten erkennbar. Im Gegensatz hierzu waren die Lebern der Mäuse unter Paigen-Fütterung (Grm1/Paigen) hell-rot bis hell-beige gefärbt. Die Lebern waren in allen Fällen leicht bis extrem vergrößert und wiesen eine derbe bis feste Konsistenz auf. In der HE-Färbung waren deutlich vergrößerte Hepatozyten mit erheblichen Fetteinlagerungen erkennbar (Abbildung 4-26 A).

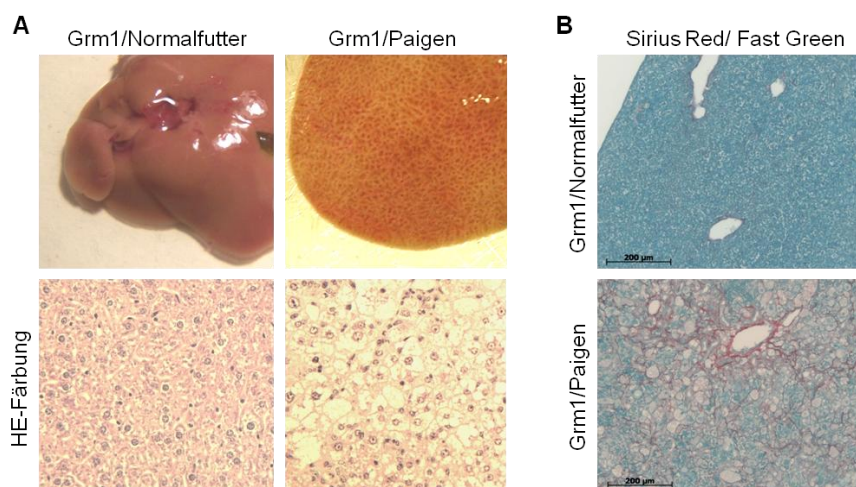


Abbildung 4-26: Auswirkungen der „Paigen“-Diät auf die Leber. (A) Die Leber von Grm1-transgenen Mäusen unter Standard-Pelletfutter (Grm1/Normalfutter) wies eine normale dunkelrote bis rotbraune Farbe und eine normale Struktur auf. In der HE-Färbung zeigten sich keine zellulären Auffälligkeiten. Die Lebern von Grm1-transgenen Tiere zeigten nach Fütterung mit einer speziellen „Paigen“-Diät eine deutliche veränderte Färbung mit hellen Strukturen auf. In der HE-Färbung waren deutlich vergrößerte Hepatozyten mit Fetteinlagerungen ins Zytoplasma erkennbar. (B) Sirius Red/Fast Green-Färbung zum immunhistochemischen Nachweis von Fibrose. Wie an den rot gefärbten Kollagenfasern erkennbar ist, wiesen Grm1/Paigen-Tiere deutliche Leberfibrosen auf. In den Lebern von Grm1-Kontrolltieren wurden keine Fibrosierungen detektiert.

Diese Befunde wiesen auf eine massive Verfettung und Schädigung der Leber in Grm1/Paigen-Tieren hin. Bei der Untersuchung dieser Tiere fiel außerdem ein allgemein erhöhter Fettanteil im Bauchraum der Tiere auf. Das Serum wies im Vergleich zur Kontrollgruppe eine ölige Konsistenz auf. Mittels immunhistochemischer Färbung wurden die Lebern der beiden Versuchsgruppen zusätzlich auf Fibrosierung untersucht (3.2.2.6.3). Grm1/Paigen-Tiere zeigten dabei deutliche Fibrosen in der Leber während diese in der Grm1-Kontrollgruppe nicht

detektierbar waren (Abbildung 4-26 B). Die Paigen-Diät führte demnach in der Grm1/Paigen-Versuchsgruppe zur Leber- und Körperv fettung sowie zu Leberschädigungen in Form von Fibrosierung.

4.4.2 Der Einfluss von Verfettung auf die Melanomentstehung im Grm1/Paigen Modell

Ob sich die massive Verfettung aufgrund der Paigen-Fütterung auch auf die Entstehung von Melanomen im Grm1-Mausmodell auswirkt, wurde durch die wöchentliche Dokumentation des Tumorwachstums analog 4.2.2.1 untersucht und mittels des beschriebenen Klassifikationssystems bewertet (siehe 4.1.1). Bei der Bestimmung des Melanom-onsets zeigte sich, dass bei Grm1-Tieren unter Normalfütterung mit durchschnittlich 127,8 Tagen zum ersten Mal Melanomwachstum auftrat. Wurden Grm1-transgene Mäuse dagegen mit Paigen-Futter versorgt, trat der Beginn des Melanomwachstums an Ohren, Schwanz und Anus signifikant früher als in der Kontrollgruppe auf (Abbildung 4-27 A). Mit durchschnittlich 106,4 Tagen zeigten diese Tiere über drei Wochen früher als die Kontrolltiere zum ersten Mal Tumore. Nach Beginn des Tumorwachstums wurde die wöchentliche Dokumentation bei jedem Tier für weitere 60 Tage fortgesetzt. Anhand dieser Daten wurde die Intensität der Tumorprogression an den unbehaarten Hautregionen ausgewertet. Wie in Abbildung 4-27 B gezeigt, wiesen Grm1/Paigen-Tiere einen deutlich schnelleren und intensiveren Verlauf des Melanomwachstums auf als die Grm1-Kontrollgruppe. Diese wiesen innerhalb des gemessenen Zeitraumes einen durchschnittlichen Endwert von 2,3 auf, was im Mittel einem äußerlich leichten bis klar erkennbaren Melanomwachstum entsprach (siehe 4.1.1). Grm1/Paigen-Tiere wiesen dagegen einen deutlichen höheren Durchschnittswert von 3,3 auf. Dies entsprach einem äußerlich klar erkennbaren Tumorwachstum bis deutlich knotenartig wachsenden Melanomen. Die Verfettung der Leber führte demnach in Grm1-transgenen Melanommäusen zu einem deutlich verfrühten Beginn des Melanomwachstums sowie zu einer schnelleren und intensiveren Progression der Primärtumore.

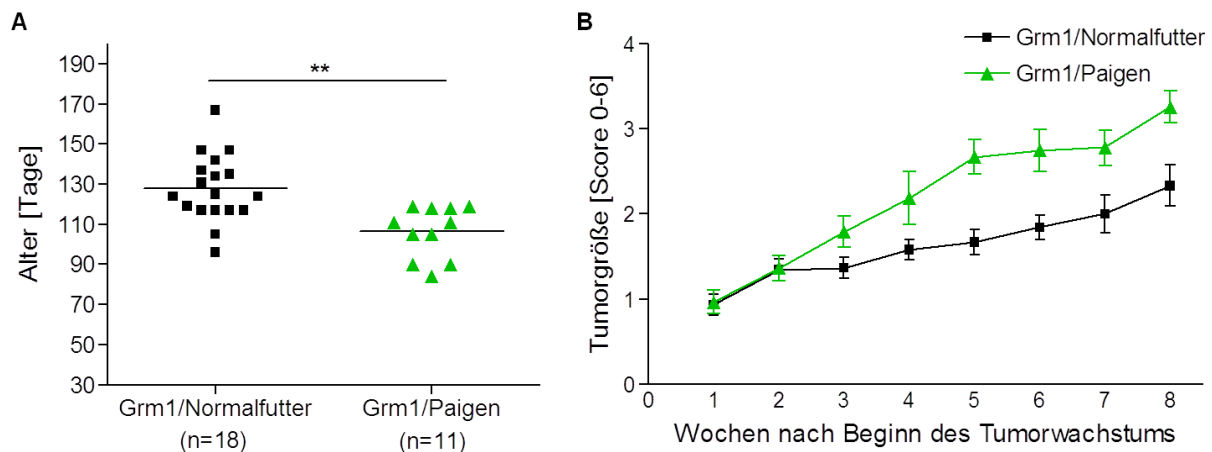


Abbildung 4-27: Vergleichende Analysen des Tumor-onsets und der weiteren Progression des Tumorwachstums an Ohren, Schwanz und Anus. (A) Grm1-transgene Tiere unter „Paigen“-Futter (Grm1/Paigen) wiesen ein signifikant früheres Einsetzen des Melanomwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe (Grm1/Normalfutter) auf. (B) Nach Beginn des Tumorwachstums zeigten Grm1/Paigen-Tiere ein deutlich stärkeres Tumorwachstum als die Grm1/Normalfutter Kontrollgruppe. Der Zeitpunkt „0“ entspricht jeweils dem mittleren Tumor-onset aus (A) (** $P < 0,01$).

Nach Ablauf der 60 Tage nach Tumor-onset erfolgte die Gewebe-Asservierung für weitere Analysen (3.2.4.4).

4.4.3 Leberverfettung und Metastasierung von Melanomzellen

Durch die Verfettung war der Beginn des Melanomwachstums bei Grm1/Paigen-Mäusen dramatisch beschleunigt. Durch die folgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob sich die Organverfettung in Grm1/Paigen-Mäusen auch auf die Metastasierung der primären Melanome auswirkt. Zunächst wurden die näheren Lymphknoten und die Milz auf disseminierte Melanomzellen untersucht. In der HE-Färbung waren dabei in beiden Versuchsgruppen deutlich pigmentierte Zellen in den inguinalen Lymphknoten erkennbar. Mittels des Grm1-spezifischen Antikörpers (3.2.2.6.2) zeigte sich in der immunhistochemischen Auswertung, dass zahlreiche disseminierte Zellen innerhalb der Lymphknoten auftraten und diese sehr häufig pigmentlos waren (Abbildung 4-28 A). In der Anzahl der Zellen war jedoch kein Unterschied zwischen der Grm1/Paigen-Gruppe und den Grm1-Kontrolltieren erkennbar. Für die Milzen wurden äquivalente Analysen durchgeführt. Dabei zeigte

sich insgesamt das gleiche Ergebnis wie bei der Auswertung der Lymphknoten (Abbildung 4-28 B). Die massive Verfettung bewirkte in Grm1/Paigen-Tieren demnach ein deutlich verfrühtes und beschleunigtes Melanomwachstum, das lymphogene Metastasierungsverhalten war hiervon jedoch nicht betroffen.

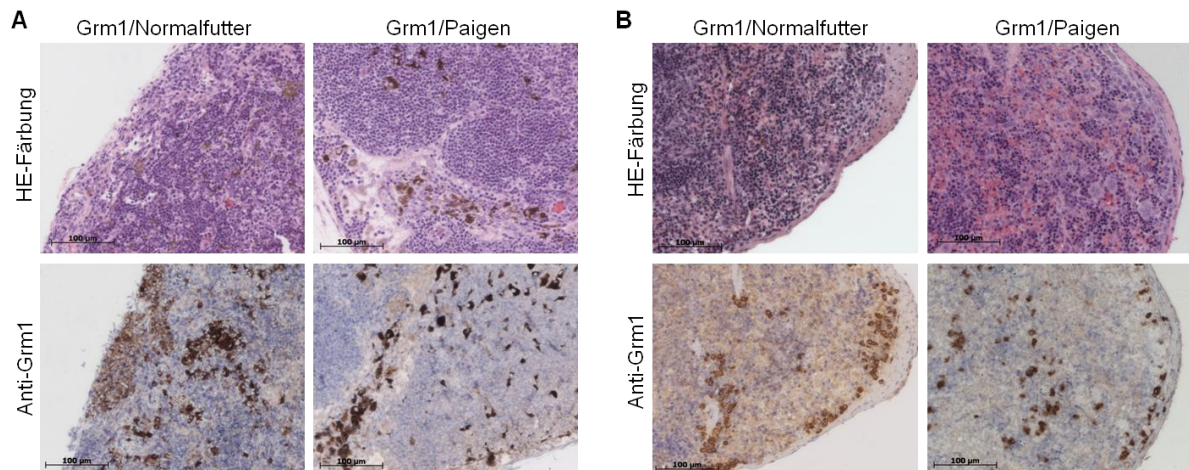


Abbildung 4-28: Untersuchung der Metastasierung in nähere Lymphknoten und in die Milz von Grm1/Paigen-Mäusen und Kontrolltieren. (A) In beiden Versuchsgruppen sind in der HE-Färbung stark pigmentierte Tumorzellen innerhalb der Lymphknoten erkennbar. Die spezifische anti-Grm1 Färbung zeigte zusätzlich, dass zahlreiche einzelne Melanomzellen und Tumornester in den Lymphknoten unpigmentiert sind. (B) Die Analyse der Metastasenbildung in der Milz ergab ein den Lymphknoten entsprechendes Ergebnis. Insgesamt konnte kein Unterschied in der Anzahl der metastasierten Tumorzellen in Lymphknoten und Milz zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden.

Im Folgenden wurde die Auswirkung der Verfettung auf die Metastasierung in die fernen Organe untersucht. Mittels HE- und spezifischen anti-Grm1 immunhistochemischen Färbungen wurden metastasierte Zellen in den Lungen von Grm1-Kontrolltieren und Grm1/Paigen-Mäusen nachgewiesen. Die vergleichende Quantifizierung erfolgte wie unter 4.1.2 beschrieben. Im immunhistochemischen Nachweis zeigten beide Versuchsgruppen spezifisch gefärbte Grm1-positive atypische Zellen und Zellnester. Wie im Vergleich zur HE-Färbung deutlich erkennbar ist, waren diese in beiden Mausgruppen meist unpigmentiert (Abbildung 4-29 A). In der Quantifizierung zeigte sich, dass die Lungen von Grm1/Paigen-Tieren eine signifikant höhere Anzahl an disseminierten Melanomzellen aufwiesen als die Grm1/Normalfutter-Kontrollgruppe. Hier waren im Durchschnitt 7,2 Grm1-positive

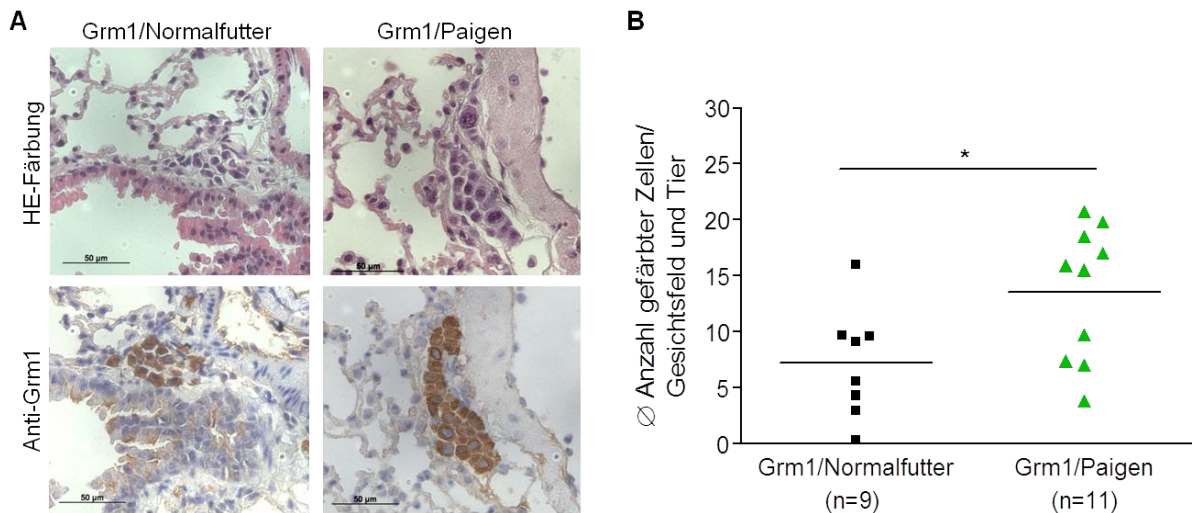


Abbildung 4-29: Nachweis von Metastasierung in die Lunge. Die Lungen von Grm1/Paigen- bzw. von Kontrolltieren wurden vergleichend auf disseminierte Melanomzellen mittels spezifischer Grm1-Färbung untersucht. Zusätzlich wurde eine HE-Färbung angefertigt. (A) In beiden Versuchsgruppen fanden sich zahlreiche Grm1-positive Zellen und Tumorzellnester in den Lungen. In der HE-Färbung sind deutlich atypische Zellen mit vermehrten Mitosen erkennbar. (B) In der Quantifizierung zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl von Melanomzellen in den Lungen von Grm1/Paigen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (* $P<0,05$).

Diese wurden von Herrn Dr. Christoph Dorn (Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) zur Verfügung gestellt. Da diese Mäuse nicht transgen sind, dürften auch unter Paigen-Ernährung keine Grm1-positiven Zellen in der Leber zu finden sein. Die Auswertung ergab, dass eine sehr geringe Anzahl an Zellen eine leichte unspezifische Färbung aufwies, insgesamt lag deren Anzahl deutlich unter den Zahlen aus der Grm1-Kontrollgruppe (Abbildung 4-30 B). Die deutlich erhöhte Anzahl von Grm1-positiven Zellen in der Leber von Grm1/Paigen-Tieren war demnach auf vermehrte Metastasierung im Vergleich zur Grm1/Normalfutter Gruppe zurückzuführen.

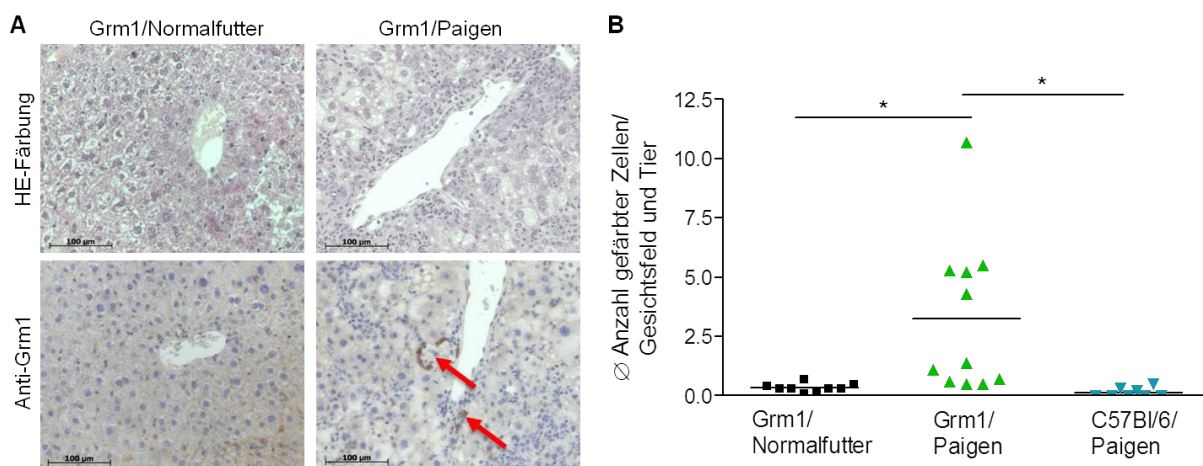


Abbildung 4-30: Untersuchung von Metastasierung in die Leber. Zum Nachweis von metastasierten Melanomzellen in der Leber wurden diese mittels spezifischer Grm1-Färbung angefärbt. Zusätzlich wurde eine HE-Färbung angefertigt. (A) In den Lebern von Grm1/Paigen-Tieren wurden zahlreiche einzelne Grm1-positive Zellen detektiert, während diese in den Lebern der Kontrolltiere nur sehr vereinzelt auftraten. (B) Die Quantifizierung der Grm1-positiven Zellen zeigt, dass in Grm1/Paigen Tieren eine signifikant größere Anzahl von Melanomzellen in der Leber zu finden sind. Im Gegensatz hierzu weisen Grm1-Kontrolltiere und die Lebern von normalen C57Bl/6 Mäusen nur eine minimale Anzahl auf (* $P < 0,05$).

Insgesamt wurde demnach die Metastasierung von Melanomzellen in den Grm1-transgenen Tieren unter Paigen-Fütterung durch die Verfettung stark begünstigt. Zielorgane waren sowohl die verfettete Leber als auch die Lunge. Bei anderen Organen gab es keine Hinweise auf Metastasierung.

4.4.4 Zusammenhang zwischen Leberfibrose und Metastasierung

Die Lebern von Grm1/Paigen-Tieren zeigten nach Beendigung des Versuches Fibrosierungen (4.4.1). Dabei wurden sowohl Lebern mit schwerer Fibrose als auch Lebern mit leichteren Schädigungen gefunden. Da auch die Anzahl der gefundenen disseminierten Tumorzellen in der Leber innerhalb der Grm1/Paigen Versuchsgruppe sehr große Schwankungen zeigte, wurde um Folgenden untersucht, ob dabei eine Korrelation zur Stärke der Fibrosierung auftritt. Hierfür wurde die Stärke der Leberfibrose anhand der optisch beurteilten Menge an rotgefärbten Kollagenfasern in der Fibrosefärbung (3.2.2.6.3) in drei Schweregrade von leichter Fibrose (Stufe 1) bis schwerer Fibrose (Stufe 3) unterteilt (Abbildung 4-31 A). In Abhängigkeit von der Fibrorestärke wurden anschließend die gefundenen Zahlen von metastasierten Melanomzellen aus Abbildung 4-30 B von allen Tieren als Summe aufgetragen. Dabei zeigte sich eine eindeutige Korrelation zwischen dem Schweregrad der Leberfibrose und dem Metastasierungsgrad. Je stärker die Fibrose, desto höher war im Durchschnitt die Anzahl an disseminierten Melanomzellen in der Leber (Abbildung 4-31 B).

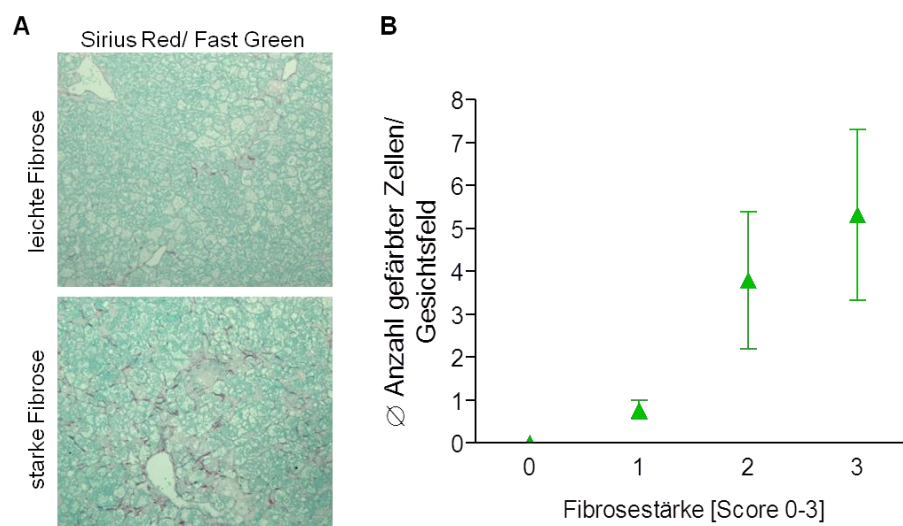


Abbildung 4-31: Korrelation zwischen der Stärke der Leberfibrose und der Metastasierung von Melanomzellen in die Leber bei Grm1/Paigen-Mäusen. (A) Innerhalb der Grm1/Paigen-Gruppe wurden mittels immunhistochemischer Sirius Red/Fast Green Färbung leicht fibrotische bis stark fibrotische Lebern gefunden. Diese wurden in die Grade 1-3 eingeteilt. (B) Die Anzahl der disseminierten Melanomzellen in der Leber korreliert bei Grm1/Paigen-Tieren positiv mit der Stärke der Leberfibrose.

Das gleiche Ergebnis ergab die Analyse der Korrelation zwischen dem Grad der Leberfibrose und der Verfettung. Je stärker die Verfettung der Leber, desto stärker war auch der Grad der Fibrosierung (Daten nicht gezeigt). Die Metastasierung der Melanomzellen in die Leber wurde demnach durch den erhöhten Fettanteil und durch die folgende Fibrose begünstigt. Unklar war an dieser Stelle, welcher Faktor letztendlich hierfür verantwortlich war. Zum einen kommen die erhöhten Fette selbst in Frage, aber auch Faktoren, welche durch den erhöhten Fettanteil oder durch die Schädigungen der Leber gebildet werden. Diese Analysen werden bereits in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Hellerbrand (Innere Medizin I, Uniklinikum Regensburg) intensiv bearbeitet, konnten jedoch aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr fertiggestellt werden.

Zusammenfassend konnte im vierten Teil dieser Arbeit zum ersten Mal *in vivo* demonstriert werden, dass eine erhöhte Körperverschmelzung die Entstehung und Progression des Melanoms begünstigt. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Melanomwachstum bei Grm1-transgenen Mäusen mit erhöhter Leber- und Körperverschmelzung deutlich früher auftritt und eine stärkere Progression aufweist als bei den Kontrolltieren. Des Weiteren traten vermehrt Metastasen in Lunge und Leber auf. In der Leber korrelierte dabei der Grad der Metastasierung mit der Stärke der Leberfibrose. Die Suche nach den zugrundeliegenden Mechanismen ist Gegenstand von laufenden Untersuchungen.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Fragestellungen zur Entstehung und Progression des malignen Melanoms am Modellorganismus der Grm1-transgenen Melanommaus bearbeitet. Dieses Mausmodell eignete sich hierfür besonders gut, da es zur spontanen Entstehung von Melanomen in allen transgenen Tieren innerhalb relativ kurzer Zeit kommt (Pollock, et al., 2003). Ein weiterer Vorteil des Modells ist, dass keine äußerlichen Einflüsse wie beispielsweise der Einsatz von Karzinogenen nötig sind, um das neoplastische Wachstum zu induzieren. In den ersten beiden Teilen der vorliegenden Arbeit wurde durch Kreuzungen der Grm1-Mauslinie mit dem MIA- bzw. BMP6-defizienten Mausmodell die Rolle von MIA bzw. BMP6 auf das Melanomwachstum und die weitere Tumorprogression untersucht. Als epidemiologischer Aspekt wurde in einer weiteren Studie untersucht, ob sich die Verfettung der Leber und ein erhöhter Körperfettanteil auf die Melanomentstehung und die Metastasierung auswirken. Zusätzlich konnten neue wichtige Erkenntnisse über das Grm1-Mausmodell gewonnen werden. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Arbeiten unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur diskutiert.

5.1 Nähere Charakterisierung und neue Erkenntnisse über das Grm1-transgene Mausmodell

Das Tg(*Grm1*)EPv-Mausmodell (Grm1) wurde im Labor von Prof. Suzie Chen generiert, nachdem ein durch Zufall entstandenes transgenes Mausmodell (TG3) mit der Entwicklung von massiven Melanomen einen überraschenden Phänotyp zeigte. Im Gegensatz zum TG3-Modell, konnten Pollock und Kollegen bei der Grm1-Mauslinie keine Metastastasenbildung in den fernen Organen feststellen (Pollock, et al., 2003; Zhu, et al., 1998). Aufgrund unserer speziellen Fragestellungen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine weitere intensive Charakterisierung des beschriebenen Phänotyps. Dabei konnten einige neue Erkenntnisse über das Mausmodell gewonnen werden, die in die folgenden drei Teile dieser Arbeit mit einbezogen wurden.

5.1.1 Grading-System zur eindeutigen Beschreibung des primären Melanomwachstums bei Grm1-transgenen Mäusen

Die vorliegenden Fragestellungen dieser Arbeit setzten eine detaillierte Beschreibung und Dokumentation des Melanomwachstums in den jeweiligen Versuchsgruppen voraus. Bei Transplantationsmodellen an Nacktmäusen beispielsweise wird das Tumorwachstum durch Vermessen der einzelnen Tumore dokumentiert. Da beim Grm1-transgenen Mausmodell meist keine abgegrenzten Melanome entstehen, war das Vermessen der Tumore in unseren Studien nicht möglich. Beim humanen Melanom und auch bei allen anderen Tumorarten wurden spezielle Systeme zur Einteilung der Art und Größe sowie der Progression des diagnostizierten Tumors etabliert. Beim Melanom werden dabei die Größe und Eindringtiefe eines Tumors durch den Breslow-Index und den Clark-Level beschrieben. Dies sind wichtige Merkmale für die weitere Prognose und die Auswahl der Therapien (Clark, et al., 1969; Breslow, 1970; Breslow, 1977). Im vorliegenden Versuch wurde daher ein analog anwendbares System entwickelt, welches das Tumorwachstum der Grm1-Mäuse an den unbehaarten Hautregionen in 6 Stufen beschreibt (4.1.1). Anhand dieses neuen für die Grm1-Maus entwickelten Grading-Systems konnte das Tumor-onset bei jedem Tier mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Zusätzlich ermöglichten die Aufzeichnungen über längere Zeitabschnitte eine Beurteilung der Progression des Melanomwachstums. Wie im Vergleich des Melanomwachstums bei pigmentierten und nicht-pigmentierten Grm1-Mäusen gezeigt hat, wurde das Tumor-onset bei der Albinogruppe zwar früher erkannt, die Stärke des weiteren Verlaufes blieb jedoch vergleichbar (siehe 4.3.3.1 und 4.4.2). Das Grading-System ermöglicht somit einen reproduzierbaren direkten Vergleich von Tumorentstehung und dem weiteren Verlauf des Melanomwachstums und stellt für die künftigen Studien am Grm1-transgenen Melanommodell eine wichtige experimentelle Anwendung dar.

5.1.2 Grm1-transgene Mäuse weisen zahlreiche unpigmentierte Melanommetastasen in peripheren Organen auf

Während der ersten Analysen fielen in einzelnen HE-Schnitten von Lungen aus Grm1-transgenen Tieren pigmenthaltige Zellen auf (siehe 4.1.2). Dieser Befund wies

auf eine höhere Metastasierungsrate in der Grm1-transgenen Maus hin als bisher angenommen (Pollock, et al., 2003). Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, wurde ein immunhistochemischer Nachweis für metastasierte, Grm1-exprimierende Melanomzellen etabliert. Beim Menschen treten Melanommetastasen bevorzugt in Lymphknoten, Lunge, Leber und Gehirn auf, daher wurde der Fokus auf die Analyse dieser Organe gelegt (Leiter, et al., 2004). Dabei zeigte sich, dass in den Lymphknoten und in der Milz nicht nur deutlich pigmentierte Zellen eine hohe Grm1-Expression aufwiesen, sondern auch eine Vielzahl an weiteren, unpigmentierten Zellen. Durch weitere immunhistochemische Färbungen gegen TRP2 konnte bestätigt werden, dass es sich bei diesen Zellen eindeutig um unpigmentierte Melanomzellen handelte. Diese waren nicht nur in den Lymphknoten und in der Milz in großer Zahl detektierbar, bei weiteren Analysen wurden diese Zellen auch in der Lunge und in geringerem Maß in der Leber von Grm1-Mäusen nachgewiesen. Es konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, dass es bei der Grm1-Maus, entgegen der bisherigen Annahmen, auch zur Fernmetastasierung kommt (Pollock, et al., 2003). Diese Zellen zeigen jedoch einen deutlich veränderten Phänotyp im Vergleich zu den stark pigmentierten Primärtumoren. Da Grm1 im Gehirn physiologischerweise stark exprimiert wird, konnte die Suche nach Gehirnmastasen nicht mit dieser Methode durchgeführt werden (Hermans, et al., 2001). In TRP2-Färbungen ergaben sich bislang jedoch keine Hinweise auf disseminierte Melanomzellen.

Die Pigmentierung spiegelt bei melanozytären Zellen den Grad der Differenzierung wieder. Melanozyten entstammen bei Vertebraten aus dem Neuralrohr, wo sich unter dem Einfluss spezifischer Faktoren unpigmentierte, unreife Vorläuferzellen, die Melanoblasten, ausbilden. Diese wandern in die Epidermis der Haut, wo sie zu pigmentbildenden Melanozyten ausdifferenzieren. Melanoblasten befinden sich in einem dedifferenzierten Zustand, da sie noch keine Pigmentierung, jedoch eine hohe Proliferations- und Migrationsaktivität aufweisen (Thomas, et al., 2008; Bosserhoff, et al., 2011). Metastasierte Melanome zeigen sehr häufig einen ähnlichen Phänotyp und können in unterschiedlichen Differenzierungsgraden auftreten. Während primäre Melanome der Haut häufig stark pigmentiert sind, können Melanom-Metastasen völlig unpigmentiert sein sowie unterschiedliche zelluläre Morphologien aufweisen. Die Ausprägung der Dedifferenzierung hängt einerseits von dem Muster der

veränderten Genregulation ab, andererseits auch von der Gewebeumgebung (Villanueva, et al., 2008). Während Melanomzellen in der Haut vor allem mit Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen in Kontakt stehen, sind beispielsweise Lungenmetastasen oder Hirnmetastasen von einem völlig anderen Gewebe umgeben (Lee, et al., 2007). Um in diesem „fremden“ Gewebe überleben zu können, müssen sich die Tumorzellen über die Variation der Genexpression anpassen. Dadurch kommt es häufig zum Abschalten der Pigmentierung und zu zahlreichen weiteren phänotypischen und molekularen Veränderungen (Leiter, et al., 2004). Da nur die besonders angepassten Tumorzellen überleben und neue Tumore ausbilden, unterscheiden sich Melanommetastasen daher häufig molekular in hohem Maß vom ursprünglichen Primärtumor (Santiago-Walker, et al., 2009; Kuphal, et al., 2009). Die Ergebnisse aus den durchgeführten Analysen zeigten, dass dies auch im Grm1-Melanommodell der Fall ist. Die Primärtumore an Ohren, Schwanz und Anus waren in allen Fällen extrem pigmentiert. In den lymphatischen Geweben hingegen wurden sowohl pigmentierte als auch unpigmentierte Zellen gefunden. Nahezu alle disseminierte Melanomzellen in Lunge und Leber waren ohne Pigmentierung und damit vermutlich am wenigsten differenziert. Das Melanom-Mausmodell spiegelt somit die Situation im Menschen sehr gut wider. In zukünftigen Studien sollte anhand dieses Modells genauer untersucht werden, wie sich diese wenig differenzierten disseminierte Melanomzellen von den Primärtumoren molekular unterscheiden. Auf diese Weise könnten weitere unbekannte Mechanismen der Metastasierung des humanen Melanoms aufgeklärt werden.

In weiteren Analysen konnten disseminierte Melanomzellen auch im Knochenmark von Grm1-transgenen Tieren nachgewiesen werden (siehe 4.1.2). Obwohl äußerlich noch keine oder sehr kleine Primärtumore vorhanden waren, wies das Knochenmark von jungen Mäusen bereits eine deutliche Grm1-Expression auf. Diese stieg in bereits Tumor-tragenden Mäusen deutlich auf bis über 20-fache Werte an. Diese Daten zeigen, dass der Nachweis von Grm1-positiven Zellen mittels qRT-PCR sensitiv und quantifizierbar ist. Auch beim humanen Melanom kommt es bereits bei einer sehr geringen Dicke des primären Melanoms zur Metastasenbildung (Garbe, et al., 2009). In zukünftigen Untersuchungen soll der genaue Zeitpunkt, an welchem

eine Grm1-Expression im Knochenmark nachweisbar ist, weiter eingegrenzt werden, um weitere Aspekte der Metastasierung aufzuklären.

5.1.3 Eine immortale melanozytäre Zelllinie aus der Grm1-transgenen Maus als neues Zellkulturmodell

Durch *in vivo* Studien an Mausmodellen können grundlegende Effekte von Faktoren auf die Melanomentstehung und die weitere Progression vor dem Hintergrund des ganzen Organismus untersucht werden. Weitere interessante Möglichkeiten bieten sich auch durch primäre Zellen, welche aus dem entsprechenden Mausmodell stammen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Isolierung von Melanozyten aus der Epidermis von neugeborenen Grm1-transgenen Tieren durchgeführt (siehe 4.1.3). Die Methode wurde freundlicherweise von Dr. Sebastian Franken (Institut für Biochemie und Molekulare Biologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Dabei konnten in mehreren Versuchen unterschiedlich stark pigmentierte Melanozyten isoliert und kultiviert werden, die sich durch ihre spindelförmige bis dendritische Morphologie deutlich von der Keratinozyten-Begleitkultur abgrenzen ließen. Es gelang jedoch nur in wenigen Fällen, die Zellen für längere Zeit weiter zu kultivieren. Dies war zum einen darauf zurückzuführen, dass primäre Zellen allgemein nur eine begrenzte Anzahl von Teilungen überleben können (Hayflick, 1965). Für primäre Melanozyten in Kultur wurden 12-15 Teilungen beschrieben, bis die Proliferation aufgrund Seneszenz gestoppt wird (Bandyopadhyay, et al., 2001). Grm1-transgene Melanozyten zeigten jedoch bereits nach zwei bis drei Wochen keinerlei Proliferationsaktivität mehr oder starben ab. Dies war vermutlich auf das Grm1-Transgen zurückzuführen, das in den Melanozyten zwar zur Hyperproliferation, gleichzeitig aber auch zur Hyperpigmentierung führt. Durch die extreme Pigmentbildung und aufgrund der zusätzlichen Stressfaktoren aufgrund der Zellkultur war es den Melanozyten daher vermutlich nur begrenzt möglich, zu proliferieren (Pollock, et al., 2003; Shin, et al., 2008).

Bei einer Isolierungs-Charge („E3101“) kam es jedoch zur spontanen Hyperproliferation von wenig- bis nicht-pigmentierten Zellen, die innerhalb weniger Wochen als TPA-unabhängige Zellkulturlinie mit hoch aktivem ERK-Signalweg

etabliert werden konnte (siehe 4.1.3). Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Zelllinie um transformierte melanozytäre Zellen handelt, die sich phänotypisch stark von den ursprünglich isolierten Melanozyten unterscheiden. Die fehlende Pigmentierung und die veränderte Morphologie lassen vermuten, dass es sich hierbei um stark dedifferenzierte Zellen handelt. Dabei könnte es sich zum einen um dedifferenzierte, Melanoblasten-ähnliche Vorläuferzellen handeln, da diese nach der Isolierung aus der Haut von neugeborenen Mäusen mit in der Kultur vorhanden sein können (Sviderskaya, et al., 1995). Aufgrund der fehlenden Pigmentierung und der allgemein höheren Proliferationsaktivität könnten diese in der Zellkultur einen Überlebensvorteil gehabt haben (Bosserhoff, et al., 2011). Zum anderen könnte durch spontane Mutationen oder andere Veränderungen im Genom eine Melanom-ähnliche Zelllinie entstanden sein. Dafür spricht die hohe Phosphorylierungsrate von ERK, wodurch die Zellen auch unabhängig von Medienzusätzen proliferieren konnten. Dies zeigt zudem, dass die Zellen selbst in der Lage sind, überlebenswichtige Wachstumsfaktoren und Zytokine auf autokrine Weise zu produzieren. Diese Eigenschaft grenzt allgemein Tumorzellen von normalen Zellen ab. Das Wachstum und Überleben von normalen Zellen hängt von vielen Faktoren ab und steht unter der Kontrolle des umgebenden Gewebes. Im Gegensatz hierzu können Tumorzellen auf autonome Weise wachsen und überleben, was in unkontrolliertem Zellwachstum resultiert (Hanahan, et al., 2011). In weiteren Analysen sollen diese Zellen näher charakterisiert und untersucht werden, wie sich diese Zellen von frühen Passagen unterscheiden und welche Veränderungen in der Genexpression zur vollständigen Grm1-unabhängigen Transformation geführt haben. Des Weiteren wird bereits im Nacktmaus-Tumormodell untersucht, ob E3101-Zellen *in vivo* das Potential aufweisen, Tumore auszubilden und zu metastasieren. Dieser Versuch war nach Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht beendet.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass es beim Grm1-transgenen Mausmodell, entgegen der ursprünglichen Annahme, auch zur Fernmetastasierung kommt. Zum Nachweis dieser Zellen konnte ein geeigneter immunhistochemischer Nachweis etabliert werden. Des Weiteren wurde ein Grading-System entwickelt, das in zukünftigen Studien am Grm1-Mausmodell eine vergleichbare Dokumentation von Tumor-onset und -progression

ermöglicht. Zusätzlich wurde aus dem Grm1-transgenen Mausmodell eine immortale melanozytäre Zelllinie etabliert, die nach genauer Charakterisierung ein interessantes murines Zellkulturmodell für Studien am Melanom darstellen wird.

5.2 Die kontroverse Rolle des Onkogens MIA im malignen Melanom

Im zweiten Teilabschnitt dieser Arbeit wurde die Rolle des Onkogens MIA (*melanoma inhibitory activity*) in der Entstehung des malignen Melanoms am Grm1-transgenen Mausmodell untersucht. *In vitro* und *in situ* konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass MIA im Melanom im Vergleich zu Melanozyten stark überexprimiert vorliegt und durch Inhibition von Zell-Matrix Kontakten die Disseminierung von Melanomzellen aus dem Tumorverband und damit die Metastasierung fördert. Die Menge der MIA-Sekretion korreliert dabei mit der Stufe der Tumorprogression, daher eignet sich MIA als diagnostischer Serummarker (Bosserhoff, et al., 2001; Bosserhoff, et al., 2003). Da die Expression von MIA bereits in vielen benignen Nävi nachweisbar ist und zudem gezeigt werden konnte, dass durch MIA selbst andere Melanom-assoziierte Faktoren reguliert werden, ist das Molekül vermutlich auch an der frühen Entstehung des Melanoms beteiligt (Poser, et al., 2004; Tatzel, et al., 2005; Schiffner, et al., 2011).

5.2.1 MIA-defizienten Melanommäuse weisen ein beschleunigtes Melanomwachstum auf

Um aufzuklären, welche Rolle MIA in der frühen Melanomentstehung spielt, wurde eine MIA-defiziente Grm1-transgene Melanom-Mauslinie gezüchtet und anschließend charakterisiert. In Melanomproben von Grm1/MIA+/+ Tieren konnte eine starke MIA mRNA-Expression detektiert werden, die in der MIA-defizienten Linie nicht nachweisbar war. Das Mausmodell war somit für die geplanten Untersuchungen geeignet. Durch wöchentliche Dokumentation des Tumorwachstums an den unbehaarten Hautregionen wurde das Tumor-onset bestimmt und die weitere Progression verfolgt (siehe 4.2.2). Dabei zeigten Grm1/MIA-/- Mäuse durchschnittlich einen signifikant früheren Beginn des Melanomwachstums als die Grm1/MIA+/+ Kontrolltiere. Da MIA als Onkogen

bekanntlich zur Progression des malignen Melanoms beiträgt (Bosserhoff, 2005), war dieses Ergebnis sehr überraschend. Die bisherigen Erkenntnisse stammen jedoch ausschließlich aus *in situ* und *in vitro* Analysen, dabei konnte der stufenweise Prozess der frühen Melanomentstehung aus benignen Vorstufen nicht erfasst werden. Im Gegensatz hierzu kommt es beim Grm1-Mausmodell zur spontanen und stufenweisen Entstehung von Melanomen aus melanozytären Läsionen entsprechend der humanen Situation (Clark, et al., 1984; Gray-Schopfer, et al., 2007). Deshalb zeigt dieses Ergebnis deutlich, dass MIA in der frühen Tumorentstehung eine andere Rolle spielt als im fortgeschrittenen Stadium. Der klare Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen im Zeitpunkt der Melanomentstehung zeigt, dass MIA in die frühe Melanomentstehung involviert ist, zu diesem Zeitpunkt jedoch noch keine Tumor-fördernde Wirkung aufweist. Diese konträre Funktion ist im humanen Melanom bereits für einige onkogene Moleküle, vor allem im Hinblick auf Onkogen-induzierte Seneszenz beschrieben (Giuliano, et al., 2011). Ein Beispiel hierfür ist das Onkogen B-RAF(V600E), welches in 50-70% der Melanome vorhanden ist und über die konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalweges massiv zum Tumorwachstum und zur Progression beiträgt (Davies, et al., 2002). B-RAF(V600E) ist jedoch bereits in über 80% der benignen Nävi zu finden, die sich trotz Onkogen-Aktivierung im proliferativen Arrest (Seneszenz) befinden (Pollock, et al., 2003). Dabei konnte gezeigt werden, dass das B-RAF(V600E) Onkogen in Melanozyten zur Induktion von Onkogen-induzierter Seneszenz (OIS) führt, wodurch die Entstehung von malignen Tumoren unterbunden wird (Michaloglou, et al., 2005). Erst durch weitere Ereignisse, wie zum Beispiel durch den Verlust des Tumorsuppressors PTEN, kann der Proliferationsstopp umgangen werden und es kommt zur weiteren Transformation der Nävuszellen und damit zur Melanomentstehung (Dankort, et al., 2009). Die Ergebnisse aus dem vorliegenden Versuch weisen deutlich darauf hin, dass die Induktion MIA einen ähnlichen Mechanismus auslösen könnte. Da Grm1/MIA+/+ Tiere ein deutlich späteres Tumor-onset als die Grm1/MIA-/- Versuchsgruppe aufwiesen, muss es in den Grm1/MIA+/+ Mäusen zu einer Verzögerung oder einem vorübergehenden Ausbleiben der Grm1-induzierten melanozytären Hyperproliferation gekommen sein. Aufgrund von früheren Versuchen an MIA-defizienten HMB2-Zellklonen kann eine

Wirkung von MIA auf Apoptose vernachlässigt werden (Poser, et al., 2004). Deshalb ist anzunehmen, dass die Induktion von MIA im Grm1-Mausmodell zum Anhalten der Grm1-gesteuerte melanozytären Hyperproliferation in Form von Seneszenz führte. Um dies nachzuweisen, sollte an Kryoschnitten von Hautproben aus den beiden Mauslinien die Expression von MIA und die gleichzeitige Induktion von Seneszenz nachgewiesen werden. Dies konnte jedoch nicht erfolgreich durchgeführt werden, da der genaue individuelle Zeitpunkt der MIA-Induktion in der Haut von Mäusen aufgrund natürlicher Schwankungen nicht eindeutig bestimmt werden kann (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde im Zuge dieser Arbeit bereits mit der Generierung einer Gewebebank begonnen, welche eine Zeitreihe von Hautproben aus Grm1/MIA^{-/-} und Grm1/MIA^{+/+} Mäusen enthält. Die Zeitreihe beinhaltet Hautproben im frühen Nävusstadium bis zum Übergang in das maligne Tumorwachstum. Mit Hilfe dieser Gewebebank soll der Zeitpunkt der MIA-Expression in der Haut eingegrenzt werden, um die gleichzeitige Induktion von Seneszenz nachweisen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese aufwendigen Zucht- und Archivierungsarbeiten noch nicht beendet werden. Aus diesem Grund wurden die Analysen mit Hilfe von kultivierten humanen epidermalen Melanozyten (NHEM) fortgeführt.

5.2.2 MIA spielt eine Rolle in der Seneszenz von humanen Melanozyten und Melanomzellen

Die Daten aus den Kreuzungsversuchen am murinen Melanommodell weisen darauf hin, dass es durch die Induktion von MIA im Grm1-Mausmodell zu einem vorübergehenden Proliferationsstopp der melanozytären Zellen in Form von Seneszenz gekommen ist. Die Inhibition des Zellzyklus und damit der Proliferation ist ein wichtiges Kennzeichen von Seneszenz (Ohtani, et al., 2009). Bei der Überprüfung des NHEM-Modellsystems zeigte sich, dass die MIA-Expression in Melanozyten mit dem vermehrten Auftreten von seneszenten Zellen korreliert (siehe 4.2.3). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob sich die Seneszenz von Melanozyten durch die siRNA-vermittelte Herabregulation von MIA beeinflussen lässt. Es zeigte sich, dass der Anteil an seneszenten Melanozyten bei reduzierter MIA mRNA- und Proteinexpression signifikant verringert werden konnte. Gleichzeitig

wurde eine deutliche Steigerung der Proliferationsaktivität detektiert. Damit konnte gezeigt werden, dass MIA im Mechanismus der Seneszenz von Melanozyten eine Rolle spielt.

Neben der klassischen SA- β -Galaktosidase Färbung nach Dimri et al. sind zahlreiche weitere Marker beschrieben, durch deren Analyse seneszente Zellen identifiziert werden können (Dimri, et al., 1995). Dabei handelt es sich unter anderem um die Inhibitoren des Zellzyklus. Seneszenz wird vor allem über die p16/INK4-pRB und die p14/ARF-p53 Wege vermittelt (Bennett, 2003). In seneszenten Zellen und Geweben werden daher häufig die Zellzyklus-Inhibitoren p14 und p16 verstärkt exprimiert. Des Weiteren kann die Expression von p15/INK4B, p21/CIP1 und p27/KIP1 im Rahmen von Seneszenz induziert sein und es kommt zum Anhalten des Zellzyklus und damit zum Proliferationsstopp (Campisi, 2005; Collado, et al., 2006). Im vorliegenden Versuch wurde die Expression dieser Zellzyklus-Inhibitoren in den si-MIA behandelten seneszenten Melanozyten untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression von p15, p16 und p27 nicht beeinflusst wurde, während p14 leicht verringert wurde. Ein deutlicher Effekt war bei der Expression von p21 zu messen, da dieser Faktor nach Herabregulation von MIA signifikant verringert wurde. MIA ist somit über den Zellzyklus-Inhibitor p21/CIP1 am Mechanismus von Seneszenz in Melanozyten beteiligt. Auch für andere Moleküle konnte bereits gezeigt werden, dass diese über p21 Seneszenz in Melanozyten induzieren (de Keizer, et al., 2010). Die Expression von p14 war nach dem MIA-*knockdown* ebenfalls leicht verringert. P14 reguliert auf negative Weise MDM2, wodurch der Abbau von p53 durch MDM2 verhindert und p21 induziert wird. P21 wiederum inhibiert den Zellzyklus durch Inhibierung des CyclinE1/CDK2 Komplexes (Sekulic, et al., 2008). Die MIA-vermittelte Seneszenz wird daher über den p14/ARF-p53 Weg reguliert. Die genauen molekularen Mechanismen sind Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Dabei sollen durch Überexpression von MIA in Melanozyten der Mechanismus und die beteiligten Moleküle der MIA-vermittelten Seneszenz aufgeklärt werden. Dies soll in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Peter Adams (Universität Glasgow) unter Verwendung von lentiviralen Vektoren durchgeführt werden.

Wie bereits beschrieben, sind bereits einige Tumor-assoziierte Moleküle bekannt, die in melanozytären Zellen als Stimulus für die Induktion von Onkogen-induzierter Seneszenz wirken können. Die zugehörigen Signalwege und Verbindungen zu den *downstream*-Effektormolekülen sind jedoch weitgehend unbekannt. In den letzten Jahren wurden jedoch zahlreiche sekretierte Faktoren wie Zytokine und deren Rezeptoren identifiziert, die hierbei eine wichtige Rolle spielen. Für die Interleukine 6 und 8 wurde beispielsweise gezeigt, dass diese im Zuge der B-RAF(V600E) induzierten OIS sekretiert werden und als Effektormoleküle wirken (Kuilman, et al., 2008). Des Weiteren konnte eine Beteiligung verschiedener IGFBP-Moleküle (*insulin-like growth factor binding protein*) nachgewiesen werden (Kim, et al., 2007; Wajapeyee, et al., 2008; Scurr, et al., 2010). Es konnte ferner gezeigt werden, dass der Chemokin-Rezeptor CXCR2 in seneszenten Zellen verstärkt exprimiert vorliegt (Acosta, et al., 2008). Diese Studien verdeutlichen, dass das Sekretom beim Mechanismus der OIS eine bedeutende Rolle spielt. Eine weitere Möglichkeit wäre es deshalb, dass auch das sekretierte MIA-Protein als Effektormolekül in die melanozytäre Seneszenz involviert ist. Dagegen spricht jedoch, dass MIA, ähnlich wie B-RAF(V600E) im späteren Tumorverlauf als starkes Onkogen wirkt und die Metastasierung von Melanomzellen fördert (Bosserhoff, et al., 2001). In Behandlungsstudien von Melanozyten mit rekombinantem MIA-Protein ergaben sich diesbezüglich ebenfalls keine Hinweise, da die äußerliche MIA-Behandlung bislang keinen Hinweis auf die Induktion von Seneszenz lieferte (Daten nicht gezeigt). Für Melanomzellen konnte zwar gezeigt werden, dass eine Behandlung mit rekombinantem MIA zu einer verringerten Aktivität des MAPK-ERK Signalweges führt, dieser Effekt war jedoch abhängig von der Expression der Integrine $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ (Bauer, et al., 2006). Da diese Rezeptoren von normalen Melanozyten nur gering exprimiert werden, hat MIA vermutlich deshalb äußerlich keine inhibierende Wirkung auf Melanozyten (Johnson, 1999; Kuphal, et al., 2005).

Insgesamt weisen diese Daten deutlich darauf hin, dass die Induktion von MIA in normalen Melanozyten mit Seneszenz korreliert und MIA vermutlich selbst einen Seneszenz-induzierenden Stimulus darstellt. In Melanomzellen wird dieser Mechanismus durch weitere unbekannte Ereignisse umgangen, da invasive Tumoren trotz hoher MIA-Expressionsrate keine oder nur sehr geringe Seneszenzraten

aufweisen. Aus diesem Grund ist die Suche nach unbekannten Faktoren die in den Mechanismus der Onkogen-induzierten Seneszenz involviert sind, Gegenstand zahlreicher aktueller Forschungsarbeiten. Unter anderem konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression von c-MYC im malignen Melanom die B-RAF(V600E)- und N-RAS(Q61R)-vermittelten Seneszenz inhibiert und somit das maligne Wachstum fördert (Zhuang, et al., 2008). Des Weiteren ist Pirin im Melanom überexprimiert, was ebenfalls der Seneszenz entgegenwirkt (Licciulli, et al., 2011). Da besonders das Melanom häufig resistent gegen Apoptose-induzierende Therapieansätze ist, bietet sich in der Induktion von Seneszenz bzw. in der Inhibition von Seneszenz-Antagonisten eine weitere Möglichkeit, der Tumorprogression entgegenzuwirken (Gorgoulis, et al., 2010). Ein interessantes Modellsystem zur Klärung dieser Fragen bietet das MIA-defiziente HMB2-Zellsystem. Wie unter 4.2.4 gezeigt, konnte in der Melanomzelllinie HMB2 eine Population an seneszenten Zellen nachgewiesen werden, die in den MIA-defizienten Zellklonen nicht mehr vorhanden ist. Aus bislang unbekannten Gründen sind in dieser Zelllinie einige Zellen noch in der Lage, in Seneszenz zu gehen. In zukünftigen Studien soll daher geklärt werden, wie sich die seneszente von der nicht-seneszenten HMB2-Population unterscheidet und welche Rolle dabei MIA bei der Umgehung des Mechanismus der OIS spielt. Dadurch könnten weitere unbekannte Wege aufgeklärt werden, wie Melanomzellen den Seneszenz-Mechanismus ausschalten und unkontrolliert proliferieren können.

5.2.3 MIA fördert die Metastasierung von Melanomzellen *in vivo*

Neben dem Beginn des Tumorwachstums wurde in den Grm1/MIA^{-/-} Mäusen der Grad der Metastasierung im Vergleich zur Grm1/MIA^{+/+} Kontrollgruppe untersucht. MIA fördert *in vitro* das Lösen von Melanomzellen aus dem Verband, indem es den Kontakt zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix inhibiert (Bosserhoff, et al., 2001; Schmidt, et al., 2010). Daher wurde im vorliegenden Versuch erwartet, dass Grm1/MIA^{-/-} Tiere eine deutlich geringere Anzahl von metastasierten Melanomzellen in den fernen Organen aufweisen als die Kontrollgruppe. Wie in 4.2.2.2 gezeigt, konnte dies *in vivo* bestätigt werden. MIA-defiziente Grm1-transgene Mäuse wiesen deutlich weniger disseminierte Melanomzellen in der Lunge und in der Leber auf. Der

Zeitpunkt der Gewebeentnahme und damit die Analyse auf Metastasierung wurden bei allen Tieren 60 Tage nach Tumor-onset durchgeführt. Damit war der Abstand zwischen dem Einsetzen des Melanomwachstums und der Beendigung des Versuches für jedes Tier und auch in beiden Versuchsgruppen gleich. Daraus lässt sich schließen, dass Grm1/MIA+/+ Tiere zwar ein späteres und langsames Wachstum der Primärtumore aufwiesen, die Metastasierung dieser Zellen setzte jedoch früher oder in höherem Maß ein als in der MIA-defizienten Versuchsgruppe. In den Grm1/MIA+/+ Tieren wirkt die Induktion der MIA-Expression der Grm1-gesteuerten Hyperproliferation zunächst entgegen, da Seneszenz induziert wird. In den prä-malignen melanozytären Läsionen wird diese vermutlich während der weiteren Grm1-gesteuerten Progression durch noch unbekannte Mechanismen überwunden. MIA wirkt in diesem Stadium also auch auf bereits maligne Zellen. Hier könnte die MIA-vermittelte Seneszenz eine Verlangsamung der Proliferation auslösen, welche sich in diesem Stadium günstig auf das Metastasierungsverhalten auswirkt. Seneszenz wurde in einigen Studien sogar mit einer pro-tumorigenen Wirkung in Verbindung gebracht. Dabei konnte gezeigt werden, dass seneszenten Fibroblasten *in vitro* und *in vivo* das Wachstum von prä-malignen und malignen Epithelzellen fördert. Durch die Ausschüttung von sekretierten Faktoren durch die seneszenten Zellen wurde in umgebenden transformierten Zellen nicht wie erwartet Seneszenz ausgelöst, sondern die Proliferation und Bildung von Tumoren begünstigt (Krtolica, et al., 2001). Da MIA ebenfalls von prä-malignen und malignen Zellen sekretiert wird, könnten die beobachteten Effekte auf einen ähnlichen parakrinen Mechanismus zurückzuführen sein. Durch die Induktion von MIA in den Nävuszellen wird Seneszenz induziert, wodurch andere, unbekannte lösliche Faktoren und auch MIA sezerniert werden. Diese Faktoren könnten auf parakrine Weise tumorfördernd auf jene melanozytären Zellen in der Umgebung wirken, die sich bereits in einem prä-malignen oder malignen Status befinden. In diesem Fall würde die Metastasierung, wie bereits für andere Zellarten gezeigt, gefördert werden (Krtolica, et al., 2001; Coppé, et al., 2010). Im Gegensatz hierzu wird in den Grm1/MIA-/- Tieren aufgrund der fehlenden Induktion der MIA-Expression der frühe Seneszenz-Mechanismus nicht aktiviert, es kommt zur ungebremsen Hyperproliferation und zum verfrühten Wachstum von malignen Tumoren. Im Gegensatz zu den

Grm1/MIA+/+ Mäusen fehlt hier jedoch MIA als ein wichtiger Treiber der Metastasierung. Aus diesem Grund waren in den MIA-defizienten Melanommäusen trotz intensiverem Wachstum der Primärtumore weniger metastasierte Zellen in den fernen Organen detektierbar.

Insgesamt konnte in diesem Abschnitt der Arbeit gezeigt werden, dass die Induktion von MIA zu einer Verzögerung der Melanomentstehung in Grm1-transgenen Mäusen führt. Ferner konnte gezeigt werden, dass MIA in den Mechanismus der Onkogen-induzierten Seneszenz von Melanozyten involviert ist. Die zugrundeliegenden Signalwege sowie die Mechanismen, wie Seneszenz in malignen Zellen umgangen werden können, sind dabei noch unbekannt und sollen in weiterführenden Studien aufgeklärt werden. Die bisherigen Erkenntnisse aus *in vitro* Studien, dass MIA die Metastasierung von Melanomzellen fördert, konnten durch diese Arbeiten auch *in vivo* bestätigt werden.

5.3 BMP6 spielt eine wichtige Rolle in der frühen Melanomentstehung

BMP-Moleküle spielen sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus eine bedeutende Rolle, da sie in eine Vielzahl an biologischen und zellulären Prozessen involviert sind (Chen, et al., 2004). BMPs konnten aber auch mit der Entstehung und Progression zahlreicher Tumorarten in Verbindung gebracht werden (Thawani, et al., 2010). Auch im malignen Melanom spielen BMPs eine bedeutende Rolle, da sie zur Tumorprogression beitragen. Eine mögliche Rolle von BMP6 im Melanom wurde bis *dato* nicht untersucht und wurde im dritten Teilabschnitt der vorliegenden Dissertation bearbeitet.

5.3.1 BMP6 ist im malignen Melanom verstärkt exprimiert

Zunächst wurde überprüft, ob im malignen Melanom eine erhöhte BMP6-Expression nachweisbar ist (siehe 4.3.1). Dabei zeigte sich, dass BMP6 im Vergleich zu Melanozyten in humanen Melanomzelllinien als Primärtumoren und Metastasen verstärkt exprimiert wird. Die Analyse von humanen Gewebeproben auf BMP6-

Expression ergab ein heterogenes Muster. Sowohl Primärtumore als auch Melanommetastasen zeigten sehr niedrige bis sehr hohe BMP6 Protein-Expressionsraten. Insgesamt konnten im Vergleich zur Normalhaut erhöhte BMP6-Proteinmengen in den Tumorproben detektiert werden. Eine Überexpression von BMP6 wurde auch in weiteren Tumorarten wie dem Osteosarkom sowie in Prostatakarzinomzellen beschrieben (Hamdy, et al., 1997; Guo, et al., 1999). Interessanterweise war in den Nävusproben noch keine BMP6-Proteinexpression detektierbar. Daraus lässt sich schließen, dass BMP6 bereits in einem sehr frühen Stadium der Melanomentstehung induziert wird und vermutlich bei der Transformation von melanozytären Zellen eine Rolle spielt. Daher wurde im nächsten Schritt die Relevanz von BMP6 in der frühen Melanomentstehung anhand eines *in vivo* Mausmodells untersucht.

5.3.2 Verzögerte Melanomentstehung in Grm1/BMP6^{-/-} Mäusen

Mittels Kreuzung wurde eine pigmentlose BMP6-defiziente Grm1-transgene Melanommauslinie sowie eine Grm1/BMP6^{+/+} Kontrolllinie generiert. Als Voraussetzung für den Versuch wurden für die BMP6^{-/-} Mauslinie keine Anomalitäten in der Entwicklung der Haut beschrieben (Solloway, et al., 1998). Beide generierte Mauslinien zeigten Melanomwachstum an den unbehaarten Hautregionen. In Melanomproben der Kontrollgruppe konnte eine deutliche BMP6-Expression nachgewiesen werden, das Mausmodell war somit für die geplanten Untersuchungen geeignet (siehe 4.3.2). In den vergleichende Analysen des Tumorwachstums wiesen Grm1/BMP6^{-/-} Tiere, im Vergleich zur Grm1/BMP6^{+/+} Kontrollgruppe, ein extrem verzögertes Tumor-onset auf. Auch die für weitere 60 Tage dokumentierte Tumorprogression verlief in der BMP6-defizienten Versuchsgruppe deutlich langsamer und milder (siehe 4.3.3.1). Aufgrund des extremen Unterschiedes im Beginn des Tumorwachstums konnten hiermit die Vermutungen aus den *in vitro* Daten eindeutig bestätigt werden. BMP6 spielt demnach in einem frühen Stadium der Melanomentstehung eine bedeutende Rolle und fördert vermutlich die Transformation von prä-malignen Nävuszellen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für BMP2 im Fall von Lungentumoren beschrieben: Dabei wurde in Lungentumoren eine

hohe BMP2-Expression detektiert, während diese in normalem Lungengewebe und in benignen Lungentumoren noch nicht nachweisbar war (Langenfeld, et al., 2003).

5.3.3 BMP6 hat *in vivo* keinen Einfluss auf Metastasierung

Für zahlreiche maligne Tumore ist bereits bekannt, dass BMPs die Metastasierung und damit die Tumorprogression fördern (Thawani, et al., 2010). Auch für BMP6 ist beschrieben, dass es in die Progression des Chondro- und Osteosarkoms sowie des Prostatakarzinoms involviert ist (Guo, et al., 1999; Thomas, et al., 2000; Dai, et al., 2005). Im Melanom konnte gezeigt werden, dass BMP4 die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen fördert (Rothhammer, et al., 2005; Rothhammer, et al., 2008), für BMP6 ist darüber bis heute nichts bekannt. Da in den durchgeführten Analysen sowohl primäre als auch metastasierte humane Melanome *in situ* teilweise eine sehr hohe BMP6-Expression aufwiesen, wurde vermutet, dass BMP6 ebenfalls in die Progression des Melanoms involviert ist. Daher wurde bei Grm1/BMP6^{-/-} Tieren eine deutlich geringere Metastasierungsrate erwartet (siehe 4.3.3.2). Aus den immunhistologischen Untersuchungen der Lymphknoten und der Milz ergab sich jedoch kein Unterschied in der Anzahl von Grm1-positiven Zellen. Sowohl Grm1/BMP6^{+/+} als auch Grm1/BMP6^{-/-} Tiere wiesen wenig bis zahlreiche disseminierte Zellen in der Milz und in den inguinalen Lymphknoten auf. Die lymphatische Metastasierung wurde somit durch BMP6 nicht beeinflusst. Die Untersuchung der Fernmetastasierung in Lunge und Leber zeigte jedoch ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Grm1/BMP6^{+/+} Tiere wiesen im Durchschnitt zwar etwas mehr disseminierte Grm1-positive Zellen in der Lunge auf als die Grm1/BMP6^{-/-} Gruppe, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Im Gegensatz zu BMP6 fördert BMP4 die Invasivität von Melanom- (Rothhammer, et al., 2008) und von Mammakarzinomzellen (Montesano, 2007) und ist somit an der Tumorprogression beteiligt. Durch Behandlung mit BMP2 wurde die Invasions- und Migrationsfähigkeit von Prostatakarzinom- (Dai, et al., 2005) und Lungenkarzinomzellen (Langenfeld, et al., 2003) deutlich erhöht. Wie unter 4.3.3.2 erwähnt, konnten die Auswertungen der Lebern nicht bei allen Grm1/BMP6^{+/+} Mäusen durchgeführt werden, da einige Tiere einen ungeklärten Leber-Phänotyp mit massiven Entzündungserscheinungen aufwiesen. Insgesamt deutete sich aber auch

in der Leber kein Unterschied in der Metastasierungsrate an. Aufgrund der besonders großen Unterschiede im Zeitpunkt der Primärtumor-Entstehung waren diese Ergebnisse sehr überraschend und zeigen deutlich, dass BMP6 im Melanom zwar überexprimiert wird, im fortgeschrittenen Stadium jedoch keinen Einfluss mehr auf die Tumorprogression hat. Wie bereits in zahlreichen Studien deutlich wurde, können BMPs sehr unterschiedliche Funktionen aufweisen, die stark vom Gewebe, vom Differenzierungsstatus und Expressionsstatus der Rezeptoren und Antagonisten abhängt (Hsu, et al., 2005). Dies konnte auch in von Frau Dr. Simone Braig durchgeführten funktionellen Analysen bestätigt werden. Dabei hatte BMP6 *in vitro* keinen Einfluss auf die Proliferation, Migration oder das Matrix-unabhängige Wachstum von Melanomzellen. Damit konnte klar gezeigt werden, dass BMP6 in der Entstehung des malignen Melanoms eine wichtige Rolle spielt, im Gegensatz zu BMP4 jedoch auf die Progression des Tumors keinen Einfluss mehr hat.

5.3.4 BMP6 fördert einen dedifferenzierten Phänotyp bei Melanozyten

Es konnte gezeigt werden, dass BMP6 keinen Einfluss auf maligne Zellen hat. Grm1/BMP6^{-/-} Mäuse wiesen jedoch einen extrem verzögerten Beginn des Tumorwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Dies bedeutet, dass durch das Fehlen von BMP6 das Wachstum der Grm1-transgenen melanozytären Zellen deutlich verlangsamt wurde. Mögliche Gründe hierfür könnten zum einen sein, dass die durch Grm1 gesteuerte Hyperproliferation durch das Fehlen von BMP6 verringert wird. Aus Literaturrecherchen ergaben sich bisher jedoch keine Hinweise darauf, dass BMP6 ein Effektormolekül des Glutamaterezeptors 1 sein könnte.

Zum anderen liegt nahe, dass BMP6 selbst eine proliferationsfördernde Wirkung in den Melanozyten oder in den frühen melanozytären Läsionen hat. In der murinen Haut wird die Expression von BMP6 ab dem Tag 15.5 der Embryogenese (15.5 d.p.c.) induziert und bleibt bis zum Tag 6 *postpartum* (6 p.p.) auf einem hohen Level (Lyons, et al., 1989; Wall, et al., 1993). BMP6 ist dabei durch die Differenzierung der Keratinozyten in die Entwicklung der Haut involviert (Drozdoft, et al., 1994; McDonnell, et al., 2001). Nach Tag 6 p.p. sinkt die BMP6-Expression dauerhaft auf einen sehr niedrigen Wert ab. Gleichzeitig mit der Induktion der BMP6-Expression

erreichen die Melanozyten ab Tag 16 d.p.c die murine Epidermis, wo sie sich bis zum Tag 6 p.p. vermehren und anschließend in die tiefere Dermis und in die Haarfollikel abwandern (Hirobe, 1984). Die Melanozyten sind zu diesem Zeitpunkt noch wenig differenziert, erst wenige Tage nach der Geburt wird die Pigmentbildung aktiviert. Demnach korreliert die BMP6-Expression in der murinen Haut sowohl mit der Differenzierung der Keratinozyten als auch mit einem dedifferenzierten Status von Melanozyten. Wie bereits erwähnt, kann die Wirkung von BMPs je nach Zelltyp sehr unterschiedlich sein (Hsu, et al., 2005). BMP6 könnte im Grm1-Mausmodell somit auch über den Einfluss auf die Differenzierung von melanozytären Zellen an der Melanomentstehung beteiligt sein, da die Effekte von BMPs stark vom Zelltyp abhängen. Auch in der Entstehung und Progression von humanen Melanomen stellt Differenzierung bzw. Dedifferenzierung einen bedeutenden Faktor dar. Deshalb wurde im Folgenden der Effekt von BMP6 auf die Differenzierung von humanen epidermalen Melanozyten untersucht (siehe 4.3.4). Dabei zeigte sich, dass durch die BMP6-Behandlung die Expression von E-Cadherin signifikant und die Expression von TRP2 leicht verringert wurden. Gleichzeitig konnten signifikant erhöhte SNAIL1- sowie leicht erhöhte SLUG-Expressionswerte detektiert werden. Dies zeigte, dass BMP6 die Differenzierung von Melanozyten verringert, während die Dedifferenzierung der Zellen gefördert wird. Auch für andere BMPs konnte bereits eine dedifferenzierende Wirkung auf Zellen gezeigt werden, wie beispielsweise für BMP3b auf Osteoblasten (Matsumoto, et al., 2011). Unser Ergebnis konnte des Weiteren durch die Analyse der BMP6-Expression in Melanoblasten-ähnlichen Zellen (MBrc), welche aus NHEM dedifferenziert wurden, bestätigt werden (Bosserhoff, et al., 2011). Im Vergleich zu den zugehörigen NHEM wiesen MBrcs eine deutlich verstärkte BMP6-Expression auf. BMP6 wird somit von melanozytären Zellen im dedifferenzierten Stadium verstärkt exprimiert. Daraus lässt sich schließen, dass der dedifferenzierte Status der Melanoblasten durch BMP6 auf autokrine Weise aufrechterhalten wird und erst im weiteren Verlauf der melanozytären Reifung durch die Expression von Inhibitoren verringert wird (Thomas, et al., 2008). Das Grm1-transgene Mausmodell ist durch eine frühe Grm1-vermittelte melanozytäre Transformation und Hyperproliferation gekennzeichnet, was in einer erhöhten Anzahl von melanozytären Zellen resultiert. Vermutlich wird durch die starke BMP6-

Expression zwischen Tag 15.5 d.p.c und Tag 6 p.p. und die gleichzeitige Transformation durch Grm1 der dedifferenzierte bzw. prä-maligne Phänotyp gefördert. Die späteren primären Melanome aus Grm1/BMP6+/- Tieren wiesen ebenfalls eine deutliche BMP6-Expression auf. Daher ist anzunehmen, dass bei Grm1-transgenen Tieren die BMP6-Expression ab Tag 6 p.p. nicht wesentlich verringert wird, wie es bei normalen Mäusen beschrieben wurde. Vermutlich werden bereits prä-maligne Melanozyten auf diese Weise im dedifferenzierten Status gehalten, was die weitere Transformation fördert. Dies soll durch Weitere Analysen der Haut von Grm1/BMP6+/- Tieren genauer untersucht und aufgeklärt werden.

Zusammenfassend konnte hiermit gezeigt werden, dass BMP6 *in vivo* eine wesentlichen Rolle in der frühen Entstehung des malignen Melanoms spielt, jedoch auf die Progression des Tumors keinen Einfluss mehr hat. BMP6 fördert die Melanomentstehung aus prä-malignen melanozytären Läsionen durch die Aufrechterhaltung eines dedifferenzierten Phänotyps.

5.4 Verfettung fördert die Entstehung und Progression des malignen Melanoms

Es ist inzwischen für zahlreiche bösartige Tumorarten bekannt, dass extremes Übergewicht und Körperv Verfettung mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko verbunden sind (Bianchini, et al., 2002). Für das maligne Melanom gibt es hierfür zwar epidemiologische Hinweise, es sind jedoch noch keine Daten aus spezifischen Studien verfügbar (Renehan, et al., 2008). Im vierten Teil dieser Arbeit wurde dieser Aspekt unter Verwendung des Grm1-transgenen Mausmodells untersucht. Hierfür wurden Grm1-Melanommäuse mit einem Spezialfutter („Paigen-Diät“) gefüttert, welches eine Verfettung der Leber und des Körpers verursacht. Im Vergleich mit Grm1-Kontrolltieren unter Standardfütterung wurde der Einfluss von Verfettung auf den Beginn des Melanomwachstums und die weitere Tumorprogression analysiert (siehe 4.4).

5.4.1 Leberverfettung fördert die Entstehung des malignen Melanoms

Die Fütterung der Paigen-Versuchsgruppe mit Paigen-Spezialfutter erfolgte ab einem Alter von 4 Wochen bis zur Beendigung des Versuches. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Lebern massive Fetteinlagerungen auf und waren in allen Fällen deutlich vergrößert. Zudem zeigten sich bei allen Lebern Fibrosierungen. Dabei wurden unterschiedliche Schweregrade von leichter bis extremer Fibrose detektiert. Paigen-Mäuse wiesen zusätzlich eine allgemein sichtbar erhöhte Körperverschmelzung auf. Die Paigendiät führte demnach auch beim Grm1-Mausmodell zur beschriebenen Verschmelzung und Schädigung von Körper und Organen, insbesondere der Leber (Paigen, et al., 1985; Matsuzawa, et al., 2007). Die vergleichende Analyse des Tumor-onsets zeigte eindeutig, dass die Melanomentstehung beim Grm1-transgenen Mausmodell durch die Verschmelzung signifikant beschleunigt wurde. Auch die über weitere 60 Tage dokumentierte Tumorprogression verlief mit einem finalen Score-Wert von über 3 deutlich schwerer als bei der Kontrollgruppe, bei der ein Maximal-Score von etwa 2 erreicht wurde. Diese Daten zeigen zum ersten Mal, dass bei einer bereits bestehenden genetischen Veränderung, in diesem Fall die Aktivierung des Glutamaterezeptors 1 in den Melanozyten, die Entstehung von Melanomen begünstigt wird. Auch für das Mammarkarzinom (Kim, et al., 2011) und für das Kolonkarzinom (Liu, et al., 2011) konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine Hochfetterernährung das Tumorentstehung fördert. Die genauen Auslöser für diese Effekte sind noch unklar. Aus Studien über andere Tumorarten kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Verschmelzung der Leber und der Organe ursächlich für diesen Effekt sind. Fettgewebe dient einerseits als Energiespeicher, daher besteht bei Übergewicht ein Überschuss an verfügbarer Energie, was die Tumorentstehung vermutlich begünstigt (Bianchini, et al., 2002). Zudem ist Fettgewebe durch die Ausschüttung von Hormonen und Wachstumsfaktoren selbst physiologisch hochaktiv. Diese Stoffe begünstigen allgemein das Wachstum von Tumorzellen. Bei einem erhöhten Körperfettanteil werden zudem größere Mengen an Insulin und Wachstumsfaktoren wie IGF-1 produziert, was bereits mit einem erhöhten Risiko für zahlreiche andere Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht wurde (Frasca, et al., 2008; Gallagher, et al., 2010). Es ist demnach davon auszugehen, dass auch im Grm1-Mausmodell ein erhöhter Anteil an verfügbarer Energie sowie eine verstärkte

Sekretion an Wachstumsfaktoren und Hormonen für das beschleunigte Melanomwachstum verantwortlich sind. Dafür spricht auch das Ergebnis einer weiteren Studie, in der subkutan injizierte B16-Melanomzellen in übergewichtigen Mäusen größere Tumoren ausbilden konnten, als in normalgewichtigen Tieren (Brandon, et al., 2009). Die physiologischen Rahmenbedingungen spielen demnach für das Wachstum von Melanomzellen eine bedeutende Rolle. Aufgrund der Daten aus dem vorliegenden Versuch und der Erkenntnisse aus epidemiologischen Studien (Renehan, et al., 2008) kann davon ausgegangen werden, dass eine übermäßige Körperversfettung auch beim Menschen das Risiko für die Entstehung eines malignen Melanoms aus benignen Vorstufen deutlich erhöht. Da prä-maligne Melanom-Vorstufen unterschiedliche Mutationen aufweisen, könnte es hierbei von Bedeutung sein, bei welchen Arten von Prädispositionen eine Verfettung das Melanomwachstum zusätzlich begünstigt wird.

5.4.2 Verfettung verstärkt die Metastasierungsrate bei Grm1-transgenen Mäusen

Bei zahlreichen Tumorarten gibt es deutliche epidemiologische Hinweise darauf, dass durch eine erhöhte Körperversfettung auch die Metastasierung positiv beeinflusst wird. Bei Brustkrebs (Carmichael, 2006; Deglise, et al., 2010) sowie beim Prostatakarzinom (Gong, et al., 2007) ist das Risiko für einen schlechten Verlauf bei gleichzeitiger Adipositas deutlich erhöht. Für das Pankreas-Karzinom konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass Übergewicht die Metastasierung der Tumorzellen fördert (Zyromski, et al., 2009). Daher ist dieser Aspekt für den Therapieerfolg von großer Bedeutung. Im vorliegenden Versuch wurden daher alle Tiere aus beiden Versuchsgruppen 60 Tage nach Beginn des primären Melanomwachstums auf disseminierte Melanomzellen in den Organen untersucht (siehe 4.4.3). Dabei wiesen alle Tiere Grm1-positive Zellen in den Lymphknoten und in der Milz auf, wobei kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt wurde. Trotz verfrühter und erhöhter Tumorlast wirkte sich die Verfettung demnach nicht auf die Metastasierung in die lymphatischen Organe aus. Durch die Paigen-Diät kommt es zur massiven Leberverfettung und -schädigung (Paigen, et al., 1985; Matsuzawa, et al., 2007). Bei der Untersuchung der Lebern von Paigen-Tieren zeigte sich, dass dies

einen deutlichen Einfluss auf die Metastasierung von Melanomzellen hat. Diese Tiere wiesen signifikant mehr metastasierte Zellen in der Leber auf, als die Kontrolltiere. Der Vergleich mit dem Ausmaß der Leberfibrose in Paigen-Tieren zeigte zudem eindeutig, dass die Menge an disseminierten Melanomzellen in der Leber mit der Stärke der Fibrose korreliert (siehe 4.4.4). Die massive Leberverfettung und -schädigung führte demnach zu einer Steigerung der Metastasierung in die Leber. Dies könnte zum einen dadurch begründet sein, dass aufgrund der Verfettung oder der Fibrose von der Leber selbst verstärkt Faktoren wie Zytokine oder Chemokine sezerniert werden, welche die Melanomzellen angelockt haben könnten. Erste Hinweise darauf ergeben sich durch eine Studie, in der die Invasionsfähigkeit von B16-Zellen durch von Adipozyten sezernierten Zytokine gesteigert werden konnte (Kushiro, et al., 2011). Überraschenderweise wiesen jedoch auch die Lungen von Paigen-Tieren eine signifikant höhere Anzahl an metastasierten Melanomzellen auf. Daher könnte die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Melanomzellen im Paigen-Modell auch durch die allgemein höhere Körperversfettung gesteigert worden sein. *In vitro* konnte die Invasivität von B16-Zellen durch Zugabe von Serum aus einem Adipositas-Mausmodell deutlich gesteigert werden (Kushiro, et al., 2011). Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht geklärt. Mit Hilfe des Grm1/Paigen-Mausmodells konnte hiermit zum ersten Mal *in vivo* gezeigt werden, dass es bei einer erhöhten Körperversfettung zur massiven Steigerung der Metastasierungsrate von Melanomzellen kommt. Um die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären, werden bereits intensive Studien in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Hellerbrand (Innere Medizin I, Uniklinikum Regensburg) durchgeführt. Unter anderem konnte dabei im Mausmodell bereits gezeigt werden, dass es nach Injektion von B16-Melanomzellen zur ausgeprägten Metastasenbildung in der Leber kommt, wenn bereits eine Verfettung der Leber vorliegt (unveröffentlichte Daten). Diese Daten bestätigen die Ergebnisse aus den Grm1/Paigen-Versuchen der vorliegenden Arbeit. Weitere Studien sollen klären, durch welche Faktoren die gesteigerten Metastasierungsraten im Rahmen einer erhöhten Körperversfettung vermittelt werden. Hierfür kommen vor allem sezernierte Faktoren in Frage, die vom Fettgewebe oder geschädigtem Gewebe direkt in hohem Maß abgegeben werden. Dazu zählen unter

anderem Wachstumsfaktoren wie beispielsweise FGF oder HGF, aber auch Zytokine und Chemokine (Halberg, et al., 2008).

Insgesamt konnte durch diese Studie zum ersten Mal *in vivo* gezeigt werden, dass die Entstehung eines malignen Melanoms aus Melanom-Vorstufen bei einer erhöhten Organ- und Körperverschöpfung deutlich begünstigt wird. Zudem wird die Metastasierung von primären Melanomen durch eine erhöhte Verschöpfung massiv gesteigert. Dieser Aspekt könnte für die Therapie von primären Melanomen von großer Bedeutung sein und sollte künftig mit berücksichtigt werden.

6 Literaturverzeichnis

Ackermann, J, et al. 2005. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res.* May 15, 2005, 65(10), pp. 4005-11.

Acosta, JC, et al. 2008. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell.* Jun 13, 2008, 133(6), pp. 1006-18.

Amling, CL. 2005. Relationship between obesity and prostate cancer. *Curr Opin Urol.* May 2005, 15(3), pp. 167-71.

Andriopoulos, B Jr, et al. 2009. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet.* Apr 2009, 41(4), pp. 482-7.

Arndt, S, et al. 2010. Iron-induced expression of bone morphogenic protein 6 in intestinal cells is the main regulator of hepatic hepcidin expression in vivo. *Gastroenterology.* Jan 2010, 138(1), pp. 372-82.

Bandyopadhyay, D, et al. 2001. The human melanocyte: a model system to study the complexity of cellular aging and transformation in non-fibroblastic cells. *Exp Gerontol.* Aug 2001, 36(8), pp. 1265-75.

Bauer, R, et al. 2006. Regulation of integrin activity by MIA. *J Biol Chem.* Apr 28, 2006, 281(17), pp. 11669-77.

Becker, JC, et al. 2010. Mouse models for melanoma: a personal perspective. *Exp Dermatol.* Feb 2010, 19(2), pp. 157-64.

Bennett, DC. 2003. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene.* May 19, 2003, 22(20), pp. 3063-9.

Bianchini, F, Kaaks, R and Vainio, H. 2002. Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol.* Sep 2002, 3(9), pp. 565-74.

Blesch, A, et al. 1994. Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. *Cancer Res.* Nov 1, 1994, 54(21), pp. 5695-701.

Bogdahn, U, et al. 1989. Autocrine tumor cell growth-inhibiting activities from human malignant melanoma. *Cancer Res.* Oct 1, 1989, 49(19), pp. 5358-63.

Bogenrieder, T and Herlyn, M. 2002. Cell-surface proteolysis, growth factor activation and intercellular communication in the progression of melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* Oct 2002, 44(1), pp. 1-15.

Bosserhoff, AK. 2005. Melanoma inhibitory activity (MIA): an important molecule in melanoma development and progression. *Pigment Cell Res.* Dec 2005, 18(6), pp. 411-6.

- Bosserhoff, AK, Ellmann, L and Kuphal, S. 2011.** Melanoblasts in culture as an in vitro system to determine molecular changes in melanoma. *Exp Dermatol.* May 2011, 20(5), pp. 435-40. .
- Bosserhoff, AK, et al. 2003.** Active detachment involves inhibition of cell-matrix contacts of malignant melanoma cells by secretion of melanoma inhibitory activity. *Lab Invest.* Nov 2003, 83(11), pp. 1583-94.
- Bosserhoff, AK, et al. 2001.** Functional role of melanoma inhibitory activity in regulating invasion and metastasis of malignant melanoma cells in vivo. *Melanoma Res.* Aug 2001, 11(4), pp. 417-21.
- Bosserhoff, AK, et al. 1999.** In situ expression patterns of melanoma-inhibiting activity (MIA) in melanomas and breast cancers. *J Pathol.* Mar 1999, 187(4), pp. 446-54.
- Bosserhoff, AK, et al. 2001.** Melanoma inhibitory activity (MIA), a serological marker of malignant melanoma. *Recent Results Cancer Res.* 2001, 158, pp. 158-68.
- Bosserhoff, AK, et al. 1997a.** Mouse CD-RAP/MIA gene: structure, chromosomal localization, and expression in cartilage and chondrosarcoma. *Dev Dyn.* Apr 1997a, 208(4), pp. 516-25.
- Bosserhoff, AK, et al. 2003.** Specific expression and regulation of the new melanoma inhibitory activity-related gene MIA2 in hepatocytes. *J Biol Chem.* Apr 25, 2003, 278(17), pp. 15225-31.
- Bosserhoff, AK, et al. 1996.** Structure and promoter analysis of the gene encoding the human melanoma-inhibiting protein MIA. *J Biol Chem.* Jan 5, 1996, 271(1), pp. 490-5.
- Bosserhoff, AK, Moser, M and Buettner, R. 2004.** Characterization and expression pattern of the novel MIA homolog TANGO. *Gene Expr Patterns.* Jul 2004, 4(4), pp. 473-9.
- Box, NF and Terzian, T. 2008.** The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* Oct 2008, 21(5), pp. 525-33.
- Bragdon, B, et al. 2011.** Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal.* Apr 2011, 23(4), pp. 609-20.
- Braig, M, et al. 2005.** Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature.* Aug 4, 2005, 436(7051), pp. 660-5.
- Brandon, EL, et al. 2009.** Obesity promotes melanoma tumor growth: role of leptin. *Cancer Biol Ther.* Oct 2009, 8(19), pp. 1871-9.
- Breslow, A. 1977.** Problems in the measurement of tumor thickness and level of invasion in cutaneous melanoma. *Hum Pathol.* Januar 1977, 8(1), S. 1-2.

- . 1970. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970, 172(5), pp. 902-908.
- Buijs, JT, et al. 2007.** Bone morphogenetic protein 7 in the development and treatment of bone metastases from breast cancer. *Cancer Res.* Sep 15, 2007, 67(18), pp. 8742-51.
- Caldwell, SH, et al. 2004.** Obesity and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* Nov 2004, 127(5 Suppl 1), pp. S97-103.
- Calle, EE and Kaaks, R. 2004.** Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer.* Aug 2004, 4(8), pp. 579-91.
- Calle, EE, et al. 2003.** Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* Apr 24, 2003, 348(17), pp. 1625-38.
- Campisi, J. 2005.** Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell.* Feb 25, 2005, 120(4), pp. 513-22.
- Carmichael, AR. 2006.** Obesity and prognosis of breast cancer. *Obes Rev.* Nov 2006, 7(4), pp. 333-40.
- Chen, D, Zhao, M and Mundy, GR. 2004.** Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* Dec 2004, 22(4), pp. 233-41.
- Chen, Z, et al. 2005.** Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature.* Aug 4, 2005, 436(7051), pp. 725-30.
- Chin, L, et al. 1997.** Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev.* Nov 1, 1997, 11(21), pp. 2822-34.
- Clark, WH Jr, et al. 1984.** A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* December 1984, 15(12), pp. 1147-65.
- Clark, WH Jr, et al. 1969.** The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* March 1969, 29(3), pp. 705-27.
- Cohen, C, et al. 2002.** Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res.* Dec, 2002, 8(12), pp. 3728-33.
- Collado, M and Serrano, M. 2010.** Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer.* Jan 2010, 10(1), pp. 51-7.
- . 2006. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer.* Jun 2006, 6(6), pp. 472-6.
- Collado, M, et al. 2005.** Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature.* Aug 4, 2005, 436(7051), p. 642.

- Coppé, JP, et al. 2010.** The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:99-118. 2010, 5, pp. 99-118.
- Cummins, Deborah L. and Cummins, Jordan M. 2006.** Cutaneous Malignant Melanoma. *Mayo Clin Proc.* April 2006, 81(4), pp. 500-7.
- Dai, J, et al. 2005.** Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism. *Cancer Res.* Sep 15, 2005, 65(18), pp. 8274-85.
- Dale, L and Jones, CM. 1999.** BMP signalling in early *Xenopus* development. *Bioessays.* Sep 1999, 21(9), pp. 751-60.
- Damsky, WE Jr and Bosenberg, M. 2010.** Mouse melanoma models and cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res.* Dec 2010, 23(6), pp. 853-9.
- Dankort, D, et al. 2009.** Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet.* May 2009, 41(5), pp. 544-52.
- Davies, H, et al. 2002.** Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* Jun 27, 2002, 417(6892), pp. 949-54.
- de Keizer, PL, et al. 2010.** Activation of forkhead box O transcription factors by oncogenic BRAF promotes p21cip1-dependent senescence. *Cancer Res.* Nov 1, 2010, 70(21), pp. 8526-36.
- De Robertis, EM and Kuroda, H. 2004.** Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004, 20, pp. 285-308.
- Deglise, C, et al. 2010.** Impact of obesity on diagnosis and treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* Feb 2010, 120(1):, pp. 185-93.
- Denoyelle, C, et al. 2006.** Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol.* Oct 2006, 8(10), pp. 1053-63.
- Dickson, RB and Stancel, GM. 2000.** Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2000, (27), pp. 135-45.
- Dietz, UH and Sandell, LJ. 1996.** Cloning of a retinoic acid-sensitive mRNA expressed in cartilage and during chondrogenesis. *J Biol Chem.* Feb 9, 1996, 271(6), pp. 3311-6.
- Dimri, GP, et al. 1995.** A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 26, 1995, 92(20), pp. 9363-7.
- Drozdoiff, V, Wall, NA and Pledger, WJ. 1994.** Expression and growth inhibitory effect of decapentaplegic Vg-related protein 6: evidence for a regulatory role in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 7, 1994, 91(12), pp. 5528-32.

- El Fitori, J, et al. 2005.** Melanoma Inhibitory Activity (MIA) increases the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Cancer Cell Int.* Feb 14, 2005, 5(1), p. 3.
- Fidler, IJ and Nicolson, GL. 1976.** Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. *J Natl Cancer Inst.* Nov 1976, 57(5), pp. 1199-202.
- Flegal, KM, et al. 2010.** Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA.* Jan 20, 2010, 303(3), pp. 235-41.
- Flötotto, T, et al. 2001.** Hormones and hormone antagonists: mechanisms of action in carcinogenesis of endometrial and breast cancer. *Horm Metab Res.* Aug 2001, 33(8), pp. 451-7.
- Frasca, F, et al. 2008.** The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. *Arch Physiol Biochem.* Feb 2008, 114(1), pp. 23-37.
- Fröhlich, E. 2010.** Proteases in cutaneous malignant melanoma: relevance as biomarker and therapeutic target. *Cell Mol Life Sci.* Dec 2010, 67(23), pp. 3947-60.
- Gaggioli, C and Sahai, E. 2007.** Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res.* Jun 2007, 20(3), pp. 161-72.
- Gallagher, EJ and LeRoith, D. 2010.** The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer. *Trends Endocrinol Metab.* Oct 2010, 21(10), pp. 610-8.
- Garbe, Claus and Leiter, Ulrike. 2009.** Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in Dermatology.* Jan-Feb 2009, 27(1), pp. 3-9.
- Geelhoed, GW, Breslow, A and McCune, WS. 1977.** Malignant melanoma: correlation of long-term follow-up with clinical staging, level of invasion and thickness of the primary tumor. *Am Surg.* Feb 1977, 43(2), pp. 77-85.
- Giuliano, S, et al. 2011.** Advances in melanoma senescence and potential clinical application. *Pigment Cell Melanoma Res.* Apr 2011, 24(2), pp. 295-308.
- Goel, VK, et al. 2006.** Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* Jan 2006, 126(1), pp. 154-60.
- Goel, VK, et al. 2009.** Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene.* Jun 11, 2009, 28(23), pp. 2289-98.
- Gong, Z, et al. 2007.** Obesity is associated with increased risks of prostate cancer metastasis and death after initial cancer diagnosis in middle-aged men. *Cancer.* 15. Mar 2007, 109(6);, S. 1192-202.
- Gorgoulis, VG and Halazonetis, TD. 2010.** Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Curr Opin Cell Biol.* Dec 2010, 22(6), pp. 816-27.

Gray-Schopfer, V, Wellbrock, C and Marais, R. 2007. Melanoma biology and new target therapy. *Nature*. February 22, 2007, 445, pp. 851-857.

Gray-Schopfer, VC, et al. 2006. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer*. Aug 21, 2006, 95(4), pp. 496-505.

Guba, M, et al. 2000. Overexpression of melanoma inhibitory activity (MIA) enhances extravasation and metastasis of A-mel 3 melanoma cells in vivo. *Br J Cancer*. Nov 2000, 83(9), pp. 1216-22.

Guo, W, et al. 1999. Expression of bone morphogenetic proteins and receptors in sarcomas. *Clin Orthop Relat Res*. 1999 Aug;(365):175-83. Aug 1999, (365), pp. 175-83.

Haass, NK, et al. 2005. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res*. Jun 2005, 18(3), pp. 150-9.

Haass, NK, Smalley, KS and Herlyn, M. 2004. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J Mol Histol*. Mar 2004, 35(3), pp. 309-18.

Haferkamp, S, et al. 2009. Oncogene-induced senescence does not require the p16(INK4a) or p14ARF melanoma tumor suppressors. *J Invest Dermatol*. Aug 2009, 129(8), pp. 1983-91.

Haferkamp, S, et al. 2009. The relative contributions of the p53 and pRb pathways in oncogene-induced melanocyte senescence. *Aging (Albany NY)*. May 16, 2009, 1(6), pp. 542-56.

Halberg, N, Wernstedt-Asterholm, I and Scherer, PE. 2008. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am*. Sep 2008, 37(3), pp. 753-68.

Haluska, FG, et al. 2006. Genetic Alterations in Signaling Pathways in Melanoma. *Clin Cancer Res*. Apr 1, 2006, 12(7 Pt 2), pp. 2301s-2307s.

Hamdy, FC, et al. 1997. Immunolocalization and messenger RNA expression of bone morphogenetic protein-6 in human benign and malignant prostatic tissue. *Cancer Res*. Oct 1, 1997, 57(19), pp. 4427-31.

Hanahan, D and Weinberg, RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. Mar 4, 2011, 144(5), pp. 646-74. Review.

Hayflick, L. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. . *Exp Cell Res*. Mar 1965, pp. 37:614-36.

Hellerbrand, C, et al. 2008. The novel gene MIA2 acts as a tumour suppressor in hepatocellular carcinoma. *Gut*. . Feb 2008, 57(2), pp. 243-51.

Hermans, E and Challiss, RA. 2001. Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochem J*. Nov 1, 2001, 359(Pt 3), pp. 465-84.

- Hirobe, T. 1984.** Histochemical survey of the distribution of the epidermal melanoblasts and melanocytes in the mouse during fetal and postnatal periods. *Anat Rec.* Apr 1984, 208(4), pp. 589-94.
- Hofmann, UB, et al. 2005.** Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie.* 2005. Mar-Apr 2005, 87(3-4), pp. 307-14.
- Hogan, BL. 1996.** Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev.* Aug 1996, 6(4), pp. 432-8.
- Holly, EA, et al. 1987.** Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol.* September 1987, 17(3), pp. 459-68.
- Hsu, MY, et al. 2008.** Aggressive melanoma cells escape from BMP7-mediated autocrine growth inhibition through coordinated Noggin upregulation. *Lab Invest.* Aug 2008, 88(8), pp. 842-55.
- Hsu, MY, et al. 2005.** Bone morphogenetic proteins in melanoma: angel or devil? *Cancer Metastasis Rev.* Jun 2005, 24(2), pp. 251-63.
- Hsu, MY, et al. 2000.** E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol.* May 2000, 156(5), pp. 1515-25.
- Hsu, MY, et al. 1996.** Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc.* Apr 1996, 1(2), pp. 188-94.
- Johnson, JP. 1999.** Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 1999, 18(3), pp. 345-57.
- Kim, EJ, et al. 2011.** Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice. *Breast Cancer Res.* Aug 11, 2011, 13(4), p. R78.
- Kim, KS, et al. 2007.** Regulation of replicative senescence by insulin-like growth factor-binding protein 3 in human umbilical vein endothelial cells. *Aging Cell.* Aug 2007, 6(4), pp. 535-45.
- Koehler, MR, et al. 1996.** Assignment of the human melanoma inhibitory activity gene (MIA) to 19q13.32-q13.33 by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genomics.* Jul 1, 1996, 35(1), pp. 265-7.
- Krtolica, A, et al. 2001.** Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 9, 2001, 98(21), pp. 12072-7.
- Kuilman, T, et al. 2008.** Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell.* Jun 13, 2008, 133(6), pp. 1019-31.

- Kuphal, S and Bosserhoff, A. 2009.** Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma. *J Pathol.* Dec 2009, 219(4), pp. 400-9.
- Kuphal, S, Bauer, R and Bosserhoff, AK. 2005.** Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* Jun 2005, 24(2), pp. 195-222.
- Kushiro, K and Núñez, NP. 2011.** Ob/ob serum promotes a mesenchymal cell phenotype in B16BL6 melanoma cells. *Clin Exp Metastasis.* Aug 31, 2011, [Epub ahead of print].
- Kushiro, K, et al. 2011.** Adipocytes Promote B16BL6 Melanoma Cell Invasion and the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Microenviron.* Sep 3, 2011, [Epub ahead of print].
- Langenfeld, EM, et al. 2003.** The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis.* Sep 2003, 24(9), pp. 1445-54.
- Larue, L and Beermann, F. 2007.** Cutaneous melanoma in genetically modified animals. *Pigment Cell Res.* Dec 2007, 20(6), pp. 485-97.
- Le, MN, et al. 2010.** The glutamate release inhibitor Riluzole decreases migration, invasion, and proliferation of melanoma cells. *J Invest Dermatol.* Sep 2010, 130(9), pp. 2240-9.
- Lee, JT and Herlyn, M. 2007.** Microenvironmental influences in melanoma progression. *J Cell Biochem.* Jul 1, 2007, 101(4), pp. 862-72.
- Leiter, U, et al. 2004.** The natural course of cutaneous melanoma. *J Surg Oncol.* Jul 1, 2004, 86(4), pp. 172-8.
- Levine, AJ. 1997.** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* Feb 7, 1997, 88(3), pp. 323-31.
- Li, G, Satyamoorthy, K and Herlyn, M. 2002.** Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002, 13(1), pp. 62-70.
- Licciulli, S, et al. 2011.** Pirin inhibits cellular senescence in melanocytic cells. *Am J Pathol.* May 2011, 178(5), pp. 2397-406.
- Lin, AW, et al. 1998.** Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* Oct 1, 1998, 12(19), pp. 3008-19.
- Little, SC and Mullins, MC. 2009.** Bone morphogenetic protein heterodimers assemble heteromeric type I receptor complexes to pattern the dorsoventral axis. *Nat Cell Biol.* May 2009, 11(5), pp. 637-43.

- Liu, Z, et al. 2011.** Diet-induced obesity elevates colonic TNF- α in mice and is accompanied by an activation of Wnt signaling: a mechanism for obesity-associated colorectal cancer. *J Nutr Biochem.* Dec 29, 2011, p. [Epub ahead of print].
- Lyons, KM, Pelton, RW and Hogan, BL. 1989.** Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes Dev.* Nov 1989, 3(11), pp. 1657-68.
- MacKie, RM, Hauschild, A and Eggermont, AMM. 2009.** Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Annals of Oncology.* August 2009, 20 Suppl 6:vi, pp. 1-7.
- Maegdefrau, U, et al. 2009.** Bone morphogenetic protein 4 is induced in hepatocellular carcinoma by hypoxia and promotes tumour progression. *J Pathol.* Aug 2009, 218(4), pp. 520-9.
- Mahabeleshwar, GH and Byzova, TV. 2007.** Angiogenesis in melanoma. *Semin Oncol.* Dec 2007, 34(6), pp. 555-65.
- Marín, YE, et al. 2006.** Stimulation of oncogenic metabotropic glutamate receptor 1 in melanoma cells activates ERK1/2 via PKCepsilon. *Cell Signal.* Aug 2006, 18(8), pp. 1279-86.
- Matsumoto, Y, et al. 2011.** Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) inhibits osteoblast differentiation via Smad2/3 pathway by counteracting Smad1/5/8 signaling. *Mol Cell Endocrinol.* Dec 1, 2011, [Epub ahead of print].
- Matsuzawa, N, et al. 2007.** Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology.* Nov 2007, 46(5), pp. 1392-403.
- McDonnell, MA, et al. 2001.** Antagonistic effects of TGFbeta1 and BMP-6 on skin keratinocyte differentiation. *Exp Cell Res.* Feb 15, 2001, 263(2), pp. 265-73.
- McGill, GG, et al. 2002.** Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell.* Jun 14, 2002, 109(6), pp. 707-18.
- Meynard, D, et al. 2009.** Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet.* Apr 2009, 41(4), pp. 478-81.
- Michaloglou, C, et al. 2008.** BRAF(E600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene.* Feb 7, 2008, 27(7), pp. 877-95.
- Michaloglou, C, et al. 2005.** BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* Aug 4, 2005, 436(7051), pp. 720-4.
- Miller, Arlo J and Mihm, Martin C. 2006.** Melanoma. *The new england journal of medicine.* July 6, 2006, 355, pp. 51-65.

- Miyazaki, H, et al. 2004.** BMP signals inhibit proliferation and in vivo tumor growth of androgen-insensitive prostate carcinoma cells. *Oncogene*. Dec 16, 2004, 23(58), pp. 9326-35.
- Montesano, R. 2007.** Bone morphogenetic protein-4 abrogates lumen formation by mammary epithelial cells and promotes invasive growth. *Biochem Biophys Res Commun*. Feb 16, 2007, 353(3), pp. 817-22.
- Mori, A, et al. 2005.** Severe pulmonary metastasis in obese and diabetic mice. *Int J Cancer*. Dec 15, 2005, 119(12), pp. 2760-7.
- Moser, M, et al. 2002.** Ultrastructural cartilage abnormalities in MIA/CD-RAP-deficient mice. *Mol Cell Biol*. Mar 2002, 22(5), pp. 1438-45.
- Mueller, BM and Reisfeld, RA. 1991.** Potential of the scid mouse as a host for human tumors. *Cancer Metastasis Rev*. Oct 1991, 10(3), pp. 193-200.
- Na, YR, et al. 2009.** Bone morphogenetic protein 7 induces mesenchymal-to-epithelial transition in melanoma cells, leading to inhibition of metastasis. *Cancer Sci*. Nov 2009, 100(11), pp. 2218-25.
- Namkoong, J, et al. 2007.** Metabotropic glutamate receptor 1 and glutamate signaling in human melanoma. *Cancer Res*. Mar 1, 2007, 67(5), pp. 2298-305.
- Narita, M, et al. 2003.** Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 2003. Jun 13, 2003, 113(6), pp. 703-16.
- Ohtani, N, Mann, DJ and Hara, E. 2009.** Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging. *Cancer Sci*. May 2009, 100(5), pp. 792-7.
- Paes, JE, et al. 2010.** The relationship between body mass index and thyroid cancer pathology features and outcomes: a clinicopathological cohort study. *J Clin Endocrinol Metab*. Sep 2010, 95(9), pp. 4244-50.
- Paigen, B, et al. 1985.** Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*. Oct 1985, 57(1), pp. 65-73.
- Palmieri, G, et al. 2009.** Main roads to melanoma. *Journal of Translational Medicine*. October 14, 2009, 7:86.
- Perez, RP, et al. 2000.** Expression of melanoma inhibitory activity in melanoma and nonmelanoma tissue specimens. *Hum Pathol*. Nov 2000, 31(11), pp. 1381-8.
- Piepkorn, M. 2000.** Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *J Am Acad Dermatol*. May 2000, 42(5 Pt 1), pp. 705-22.
- Pollock, PM, et al. 2003.** High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*. Jan 2003, 33(1), pp. 19-20.

- Pollock, PM, et al. 2003.** Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia. *Nat Genet.* May 2003, 34(1), pp. 108-12.
- Poser, I, et al. 2004.** Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma. *Oncogene.* Aug 12, 2004, 23(36), pp. 6115-24.
- Prieur, A and Peeper, DS. 2008.** Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. *Curr Opin Cell Biol.* Apr 2008, 20(2), pp. 150-5.
- Quelle, DE, et al. 1995.** Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell.* Dec 15, 1995, 83(6), pp. 993-1000.
- Raida, M, et al. 2005.** Expression of bone morphogenetic protein 2 in breast cancer cells inhibits hypoxic cell death. *Int J Oncol.* Jun 2005, 26(6), pp. 1465-70.
- Renahan, AG, et al. 2008.** Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* Feb 16, 2008, 371(9612), pp. 569-78.
- Robertson, NG, et al. 2000.** A novel conserved cochlear gene, OTOR: identification, expression analysis, and chromosomal mapping. *Genomics.* Jun 15, 2000, 66(3), pp. 242-8.
- Rothhammer, T, Braig, S and Bosserhoff, AK. 2008.** Bone morphogenetic proteins induce expression of metalloproteinases in melanoma cells and fibroblasts. *Eur J Cancer.* Nov 2008, 44(16), pp. 2526-34.
- Rothhammer, T, et al. 2005.** Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Res.* Jan 15, 2005, 65(2), pp. 448-56.
- Rothhammer, T, et al. 2007.** Functional implication of BMP4 expression on angiogenesis in malignant melanoma. *Oncogene.* Jun 14, 2007, 26(28), pp. 4158-70.
- Russo, Alessia E, Malaponte, Gracia and Torrisi, Elena. 2009.** Melanoma: Molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review). *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY.* April 28, 2009, 34(6), pp. 1481-1489.
- Santiago-Walker, A, et al. 2009.** Melanocytes: from morphology to application. *Skin Pharmacol Physiol.* 2009, 22(2), pp. 114-21.
- Schiffner, S, et al. 2011.** p54nrb is a new regulator of progression of malignant melanoma. *Carcinogenesis.* Aug 2011, 32(8), pp. 1176-82.
- Schmid, P, Itin, P and Rufli, T. 1995.** In situ analysis of transforming growth factor-beta s (TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3), and TGF-beta type II receptor expression in malignant melanoma. *Carcinogenesis.* Jul 1995, 16(7), pp. 1499-503.

- Schmid, R, et al. 2010.** Enhanced cartilage regeneration in MIA/CD-RAP deficient mice. *Cell Death Dis.* Nov 11, 2010, 1:e97.
- Schmidt, J, et al. 2010.** Migration-associated secretion of melanoma inhibitory activity at the cell rear is supported by KCa3.1 potassium channels. *Cell Res.* Nov 2010, 20(11), pp. 1224-38.
- Scurr, LL, et al. 2010.** IGFBP7 is not required for B-RAF-induced melanocyte senescence. *Cell.* May 14, 2010, 141(4), pp. 717-27.
- Scurr, LL, et al. 2011.** Selective Loss of Wild-Type p16(INK4a) Expression in Human Nevi. *J Invest Dermatol.* Nov 2011, 131(11), pp. 2329-32.
- Sekulic, A, et al. 2008.** Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc.* Jul 2008, 83(7), pp. 825-46.
- Serrano, M, et al. 1997.** Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* Mar 7, 1997, 88(5), pp. 593-602.
- Shin, SS, et al. 2008.** Oncogenic activities of metabotropic glutamate receptor 1 (Grm1) in melanocyte transformation. *Pigment Cell Melanoma Res.* Jun 2008, 21(3), pp. 368-78.
- Shultz, LD, Ishikawa, F and Greiner, DL. 2007.** Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol.* Feb 2007, 7(2), pp. 118-30.
- Sieber, C, et al. 2009.** Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* Oct-Dec 2009, 20(5-6), pp. 343-55.
- Smith, PK, et al. 1985.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* Oct 1985, 150(1), pp. 76-85.
- Solloway, MJ, et al. 1998.** Mice lacking Bmp6 function. *Dev Genet.* 1998, 22(4), pp. 321-39.
- Spangenberg, HC, Thimme, R and Blum, HE. 2009.** Targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* Jul, 2009, 6(7), pp. 423-32.
- Stahl, JM, et al. 2004.** Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* Oct 1, 2004, 64(19), pp. 7002-10.
- Starley, BQ, Calcagno, CJ and Harrison, SA. 2010.** Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology.* May 2010, 51(5), pp. 1820-32.
- Stoll, R, et al. 2001.** The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *EMBO J.* Feb 1, 2001, 20(3), pp. 340-9.
- Sviderskaya, EV, et al. 2002.** p16(Ink4a) in melanocyte senescence and differentiation. *J Natl Cancer Inst.* Mar 20, 2002, 94(6).

- Sviderskaya, EV, Wakeling, WF and Bennett, DC. 1995.** A cloned, immortal line of murine melanoblasts inducible to differentiate to melanocytes. *Development*. May 1995, 121(5), pp. 1547-57.
- Tamura, M, et al. 1998.** Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*. 1998. Jun 5, 1998, 280(5369), pp. 1614-7.
- Tannous, Zeina S, et al. 2005.** Congenital melanocytic nevi: clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *J Am Acad Dermatol*. Februar 2005, 52(2), pp. 197-203.
- Tatzel, J, et al. 2005.** Inhibition of melanoma inhibitory activity (MIA) expression in melanoma cells leads to molecular and phenotypic changes. *Pigment Cell Res*. Apr 2005, 18(2), pp. 92-101.
- Thawani, JP, et al. 2010.** Bone morphogenetic proteins and cancer: review of the literature. *Neurosurgery*. Feb 2010, 66(2), pp. 233-46.
- Thomas, AJ and Erickson, CA. 2008.** The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res*. Dec 2008, 21(6), pp. 598-610.
- Thomas, BG and Hamdy, FC. 2000.** Bone morphogenetic protein-6: potential mediator of osteoblastic metastases in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. Dec 2000, 3(4), pp. 283-285.
- Tscheudschilsuren, G, et al. 2006.** Regulation of mesenchymal stem cell and chondrocyte differentiation by MIA. *Exp Cell Res*. Jan 1, 2006, 312(1), pp. 63-72.
- Urist, MR. 1965.** Bone: formation by autoinduction. *Science*. Nov 12, 1965, 150(698), pp. 893-9.
- Villanueva, J and Herlyn, M. 2008.** Melanoma and the tumor microenvironment. *Curr Oncol Rep*. Sep 2008, 10(5), pp. 439-46.
- Wajapeyee, N, et al. 2008.** Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell*. Feb 8, 2008, 132(3), pp. 363-74.
- Wall, NA, et al. 1993.** Biosynthesis and in vivo localization of the decapentaplegic-Vg-related protein, DVR-6 (bone morphogenetic protein-6). *J Cell Biol*. Jan 1993, 120(2), pp. 493-502.
- Wang, EA, et al. 1990.** Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 1990, 87(6), pp. 2220-4.
- Widlund, HR and Fisher, DE. 2003.** Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene*. May 19, 2003, 22(20), pp. 3035-41.

Wozney, JM. 1992. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev.* Jun 1992, 32(2), pp. 160-7.

Wozney, JM, et al. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* Dec 16, 1988, 242(4885), pp. 1528-34.

Xie, WF, Zhang, X and Sandell, LJ. 2000. The 2.2-kb promoter of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein controls gene expression in cartilage and embryonic mammary buds of transgenic mice. *Matrix Biol.* Nov 2000, 19(6), pp. 501-9.

Zhu, H, et al. 2000. Development of early melanocytic lesions in transgenic mice predisposed to melanoma. *Pigment Cell Res.* Jun 2000, 13(3), pp. 158-64.

Zhu, H, et al. 1998. Development of heritable melanoma in transgenic mice. *J Invest Dermatol.* Mar 1998, 110(3), pp. 247-52.

Zhu, J, et al. 1998. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* 1998 Oct 1;12(19):2997-3007. *Genes Dev.* Oct 1, 1998, 12(19), pp. 2997-3007.

Zhuang, D, et al. 2008. C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells. *Oncogene.* Nov 6, 2008, 27(52), pp. 6623-34.

Zyromski, NJ, et al. 2009. Obesity potentiates the growth and dissemination of pancreatic cancer. *Surgery.* Aug 2009, 146(2), pp. 258-63.

7 Eigene Publikationen

Schiffner S, Zimara N, Schmid R and Bosserhoff AK: p54nrb is a new regulator of progression of malignant melanoma. *Carcinogenesis*. 2011 Aug; 32(8):1176-82.

Amusquivar E, **Schiffner S**, Herrera, E: Evaluation of two methods for plasma fatty acid analysis by gas chromatography. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2011 June; 113(6): 711-716.

Schmid R, **Schiffner S**, Opolka A, Grässel S, Schubert T, Moser M and Bosserhoff, AK: Enhanced cartilage regeneration in MIA/CD-RAP deficient mice. *Cell Death and Disease*. 2010 Nov 11; 1:e97.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchromsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	copy DNA
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N',N',N',N',Tetraacetat
ERK	Extracellular Signaling-Regulated Kinase
et al.	et alii (lat.: und andere)
etc.	et cetera (lat.: und so weiter)
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm

h	Stunde
HGF	Hepatocyte growth factor
kDa	Kilodalton
L	Liter
m	Milli (10^{-3})
M	Molar (mol/L)
mA	Milliampere
min	Minute
mRNA	messenger RNA
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
NHEM	Normale humane epidermale Melanozyten
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-büffele Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RGP	Radial growth phase
RIPA	Radio-immunoprecipitation assay
rpm	Rotations per minute

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF	Transforming growth factor
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan/Wasserstoffchlorid
TRP	Tyrosinase-related protein
U	Unit, Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VGP	Vertical growth phase
WHO	World Health Organization
(v/v)	Volumenprozent (volume per volume)
(v/w)	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
°C	Grad Celsius

8.2 Danksagung

Ich bedanke mich hiermit bei allen Personen, die mich während meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt...

...Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff für die Vergabe eines interessanten und vielseitigen Themas, für die intensive Betreuung und die vielen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeiten beigetragen haben.

...Prof. Dr. Stephan Schneuwly für die Übernahme der Betreuung und Vertretung meiner Doktorarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III.

...Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Pathologie durchführen zu können.

...Dr. Thilo Spruß für die freundliche Unterstützung bei „Maus-Problemen“.

...Peter Karl und Herbert Gabler für die gute Zusammenarbeit im Tierstall H1, für die Hilfsbereitschaft und die netten Gespräche zwischen Tür und Angel.

...vor allem Simone Kaufmann und Rudi Jung, aber auch Martina Waeber und Susanne Wallner für das Einbetten, Schneiden und Färben von vielen, vielen Mausgeweben.

...der gesamten Arbeitsgruppe Boßerhoff für die gute Zusammenarbeit und die nette Laboratmosphäre.

...Silke für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die vielen hilfreichen Anregungen.

...dem ehemaligen und aktuellen Labor 2: Barbara, Andreas, Rainer, Nicole, Matthias, Alex und Melanie für die gute Laborstimmung und Zusammenarbeit.

...nicht zu vergessen meiner „Kaffee-Runde“: Barbara, Eva, Silke, Steffi, Rainer und Stephan für die vielen wichtigen Gespräche über Arbeit und Privates, für die Unternehmungen und die Freundschaft auch außerhalb der Arbeit.

...meinen Eltern Gabi und Wolfgang und meinen Schwestern Martina und Maria, die für mich da sind und mich immer unterstützt haben sowie Sebastian für seine Geduld und die vielen Ablenkungsmanöver in stressigen Zeiten.

8.3 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Susanne Schiffner, dass ich die vorliegende Dissertation ohne unzulässige Hilfe Dritter und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, Februar 2012

.....
(Susanne Schiffner)